

<p><b>2004-554601/54</b> D13 E24  <b>SUNG- 2002.12.16</b>  SUNGENE GMBH &amp; CO KGAA  *DE 10258971-A1  2002.12.16 2002-1058971(+2002DE-1058971) (2004.07.01) A23K  1/14, A01H 5/00, C12N 15/00  <b>Use of astaxanthin-containing plant material, or extracts, from Tagetes for oral administration to animals, particularly for pigmentation of fish, crustacea, birds and their products</b>  <b>C2004-203123</b></p>	<p>D(3-G1, 3-G4) E(25-B3)</p>
<p><u><b>NOVELTY</b></u>  Use of astaxanthin (I)-containing plants of the genus <i>Tagetes</i> or their parts, or (I)-containing extracts of them, for oral administration to animals.</p> <p><u><b>DETAILED DESCRIPTION</b></u>  <b>INDEPENDENT CLAIMS</b> are also included for the following:(1) preparation of an animal feed composition by mixing standard fodder ingredients with (I)-containing plants of the genus <i>Tagetes</i> or their parts, or (I)-containing extracts of them; (2) method for pigmentation of animals, or their products, by oral administration of (I)-containing plants of the genus <i>Tagetes</i> or their parts, or (I)-containing extracts of them; and (3) animal feed composition or pigmentation agent that contains (I)-containing plants of the genus <i>Tagetes</i> or their parts, or (I)-</p>	<p>containing extracts of them.</p> <p><u><b>USE</b></u>  (I)-containing compositions are used particularly for pigmentation of animals, preferably fish, crustacea and birds, or their products (meat, skin, feathers and eggs), most particularly trout, salmon and shrimp.</p> <p><u><b>ADVANTAGE</b></u>  Genetically modified <i>Tagetes</i> produce larger amounts of (I) than the current source, <i>Adonis aestivalis</i>, and more cheaply.</p> <p><u><b>EXAMPLE</b></u>  The expression vector pSKETO2 includes a cassette consisting of the double 35S promoter; the sequence for the pea rbc transit peptide; the sequence encoding a ketolase (<math>\beta</math>-carotene-4-oxygenase) from <i>Haematococcus pluvialis</i>, and the polyadenylation signal from cauliflower mosaic virus. It was used to transform leaves of <i>Tagetes</i>, by <i>Agrobacterium</i>-mediated transfer, then these regenerated to plants.  [DE 10258971-A+]</p>

No details are given about the astaxanthin content of the transgenic plants.

#### TECHNOLOGY FOCUS

Biology - Preferred Process: The plants, or their parts or extracts, are administered directly to animals, optionally after intermediate processing, or they are formulated with fodder components. Particularly they are administered to fish, crustaceans or birds, specifically salmonids, shrimps, crabs, hens, ducks, geese and flamingoes. Preferred Materials: The flower heads and petals are particularly used.

Biotechnology - Preferred Plants: These are genetically modified to enable production of (I) and are particularly *T. erecta* and *T. patula*. Preferably they are modified to provide ketolase activity, for conversion of  $\beta$ -carotene (bC) to canthaxanthin, particularly with the highest level of expression in the flowers, e.g. by using a flower-specific promoter. The plants may also have increased activity of hydroxylase (for conversion of canthaxanthin to (I)) and/or of  $\beta$ -cyclase (to increase production of bC from  $\gamma$ -carotene). The hydroxylase and/or  $\beta$ -cyclase activities are increased by at least 5, best 600, %, relative to the wild type, particularly by e.g. switching off regulatory mechanisms or increasing gene expression, preferably by

increasing the gene copy number, altering the promoter or by application of external stimuli. Most preferred is incorporation of appropriate coding sequences. Also the  $\epsilon$ -cyclase activity can be reduced (to inhibit formation of  $\delta$ -carotene), e.g. by antisense, ribozyme, co-suppression techniques or by gene knockout. Preferred Materials: Ketolase activity is provided by any of 11 nucleic acid sequences, all reproduced together with the encoded proteins, most especially a 1771 bp sequence (1) from *Haematococcus pluvialis*, encoding a 329 amino acid (aa) protein (2) or a 777 bp sequence (15) from *Nostoc* sp. PCC7120, encoding a 258 aa protein (16). A suitable hydroxylase gene, also from *H. pluvialis*, is a 1608 bp sequence (17), encoding a 322 aa protein (18), and a suitable  $\beta$ -cyclase is a 1503 bp sequence (19) from tomato, encoding a 500 aa protein (20). All these sequences may be modified for optimal codon usage in plants. (145pp1251DwgNo.0/15)

|DE 10258971-A



(10) **DE 102 58 971 A1 2004.07.01**

## Offenlegungsschrift

(51) Int Cl.<sup>7</sup>: **A23K 1/14**  
**C12N 15/00, A01H 5/00**

(43) Offenlegungstag: 01.07.2004

(72) Erfinder:  
Erfinder wird später genannt werden

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung *Tagetes* oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung *Tagetes* zur oralen Verabreichung an Tiere, Verfahren zur Herstellung von Tierfutterzubereitungen, die Tierfutterzubereitungen selbst, ein Verfahren zum Pigmentieren von Tieren oder Tierprodukten sowie ein Verfahren zur Herstellung pigmentierter Tiere und Tierprodukte.

[illegible]

## Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung *Tagetes* oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung *Tagetes* zur oralen Verabreichung an Tiere, Verfahren zur Herstellung von Tierfutterzubereitungen, die Tierfutterzubereitungen selbst, ein Verfahren zum Pigmentieren von Tieren oder Tierprodukten sowie ein Verfahren zur Herstellung pigmentierter Tiere und Tierprodukte.

[0002] Aufgrund seiner farbgebenden Eigenschaften wird Astaxanthin als Pigmentierstoff in der Tierernährung, insbesondere in der Forellen-, Lachs- und Shrimpzucht verwendet.

[0003] Die Herstellung von Astaxanthin erfolgt heutzutage größtenteils durch chemische Syntheseverfahren. Natürliches Astaxanthin, wird heutzutage in biotechnologischen Verfahren in kleinen Mengen durch Kultivierung von Algen, beispielsweise *Haematococcus pluvialis* oder durch Fermentation von gentechnologisch optimierten Mikroorganismen und anschließender Isolierung gewonnen.

[0004] Synthetisches oder durch Isolierung gewonnenes natürliches Astaxanthin wird durch spezielle Formulierungstechniken zur Erhöhung der Lagerfähigkeit chemisch und/oder physikalisch stabilisiert und für den jeweiligen Verwendungszweck entsprechend der gewünschten Applikationsbereiche und Bioverfügbarkeiten aufbereitet.

[0005] WO 9201754 beschreibt eine astaxanthinhaltige Wildtyppflanze der Spezies *Adonis aestivalis*. Ferner offenbart das Dokument die Verwendung der astaxanthinhaltigen Petalen von *Adonis aestivalis* sowie deren Extrakte als Fischfutter oder als Zusatz in Fischfutter zur Pigmentierung von Fischen.

[0006] Die Verwendung von *Adonis aestivalis* als pflanzliche Quelle für Astaxanthin zur Pigmentierung von Fischen im Stand der Technik weist jedoch den Nachteil auf, dass der Ertrag an astaxanthinhaltiger Biomasse und damit an astaxanthinhaltigem Pflanzenmaterial pro Anbaufläche sehr gering ist, und somit nur doch kostenintensiven Anbau großer Flächen eine befriedigende Menge an astaxanthinhaltigem Pflanzenmaterial erhalten werden kann. Dies führt zu hohen Kosten bei der Herstellung entsprechender Pigmentiermittel.

[0007] Der Erfindung lag daher die Aufgabe zugrunde, Pigmentiermittel zur Verfügung zu stellen, die den Nachteil des Standes der Technik nicht mehr aufweisen.

[0008] Demgemäß wurde gefunden, dass astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung *Tagetes* oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung *Tagetes* zur oralen Verabreichung an Tiere verwendet werden können.

[0009] In einer bevorzugten Ausführungsform werden die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung *Tagetes* oder die astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung *Tagetes* zur Pigmentierung von Tieren und der entsprechenden Tierprodukte verwendet.

[0010] Unter astaxanthinhaltigen Pflanzen der Gattung *Tagetes* werden bevorzugt Pflanzen der Gattung *Tagetes* verstanden, die in mindestens einem Teil der Pflanze einen Gehalt an Astaxanthin aufweisen. Das Astaxanthin kann in freier Form in Form von Fettsäure-Di- oder Monoester vorliegen. Bevorzugte Pflanzen der Gattung *Tagetes* sind Pflanzen ausgewählt aus den Spezies *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, die auch als Marigold bezeichnet werden, *Tagetes lucida*, *Tagetes pringlei*, *Tagetes palmeri*, *Tagetes minuta*, *Tagetes lemmonii*, *Tagetes tenuifolia*, oder *Tagetes campanulata*, besonders bevorzugt *Tagetes erecta* oder *Tagetes patula*.

[0011] Unter astaxanthinhaltigen Pflanzenteilen von Pflanzen der Gattung *Tagetes* werden vorzugsweise Teile von Pflanzen verstanden, die in mindestens einem Teil des Pflanzenteils einen Gehalt an Astaxanthin aufweisen. Bevorzugte Pflanzenteile sind beispielsweise Blüten, Blütenköpfe oder besonders bevorzugt Blütenblätter, die auch als Petalen bezeichnet werden.

[0012] Wildtyppflanzen der Gattung *Tagetes* weisen kein Astaxanthin jedoch Carotinoide wie Lutein und Zeaxanthin in Blüten auf. Es wurde jedoch erfindungsgemäß gefunden, dass die Pflanzen der Gattung *Tagetes* beispielsweise durch genetische Veränderung in die Lage versetzt werden können, Astaxanthin herzustellen.

[0013] In einer bevorzugten Ausführungsform werden die Pflanzen der Gattung *Tagetes* beispielsweise dadurch in die Lage versetzt Astaxanthin herzustellen, indem in den genetisch veränderten Pflanzen der Gattung *Tagetes* im Vergleich zum Wildtyp eine Ketolase-Aktivität verursacht wird.

[0014] Unter Ketolase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Ketolase verstanden.

[0015] Unter einer Ketolase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, am, gegebenenfalls substituierten,  $\beta$ -Ionon-Ring von Carotinoiden eine Keto-Gruppe einzuführen.

[0016] Insbesondere wird unter einer Ketolase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist,  $\beta$ -Carotin in Canthaxanthin umzuwandeln.

[0017] Dementsprechend wird unter Ketolase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Ketolase umgesetzte Menge  $\beta$ -Carotin bzw. gebildete Menge Canthaxanthin verstanden.

[0018] Unter dem Begriff "Wildtyp" wird erfindungsgemäß die entsprechende nicht genetisch veränderte Ausgangspflanze der Gattung *Tagetes* verstanden.

[0019] Je nach Zusammenhang kann unter dem Begriff "Pflanze" die Ausgangspflanze (Wildtyp) der Gattung *Tagetes* oder eine erfindungsgemäße, genetisch veränderte Pflanze der Gattung *Tagetes* oder beides verstan-

den werden.

[0020] Vorzugsweise wird unter "Wildtyp" für die Verursachung der Ketolase-Aktivität, für die nachstehend beschriebene Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität, für die nachstehend beschriebene Erhöhung der  $\beta$ -Cyclase-Aktivität, und für die nachstehend beschriebene Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität und die Erhöhung des Gehalts an Astaxanthin jeweils eine Referenzpflanze verstanden.

[0021] Diese Referenzpflanze der Gattung *Tagetes* ist *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, *Tagetes lucida*, *Tagetes pringlei*, *Tagetes palmeri*, *Tagetes minuta* oder *Tagetes campanulata*, besonders bevorzugt *Tagetes erecta*, ganz besonders bevorzugt *Tagetes erecta* L., Accession number: TAG 72, Sorte Orangenprinz, erhältlich aus der Genbank des IPK, Corrensstr. 3, D-06466 Gatersleben.

[0022] Die Bestimmung der Ketolase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen der Gattung *Tagetes* und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen: Die Bestimmung der Ketolase-Aktivität in Pflanzenmaterial erfolgt in Anlehnung an die Methode von Frazer et al., (J. Biol. Chem. 272(10): 6128–6135, 1997). Die Ketolase-Aktivität in pflanzlichen Extrakten wird mit den Substraten beta-Carotin und Canthaxanthin in Gegenwart von Lipid (Sojalecithin) und Detergens (Natriumchoolat) bestimmt. Substrat/Produkt-Verhältnisse aus den Ketolase-Assays werden mittels HPLC ermittelt.

[0023] Die erfindungsgemäße genetisch veränderte Pflanze der Gattung *Tagetes* weist in dieser, bevorzugten Ausführungsform im Vergleich zum genetisch nicht veränderten Wildtyp eine Ketolase-Aktivität, vorzugsweise in Blütenblättern, auf und ist somit vorzugsweise in der Lage, transgen eine Ketolase zu exprimieren.

[0024] In einer weiter bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Verursachung der Ketolase-Aktivität in den Pflanzen der Gattung *Tagetes* durch Verursachung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Ketolase.

[0025] In dieser bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Verursachung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Ketolase vorzugsweise durch Einbringen von Nukleinsäuren, die Ketolasen kodieren in die Ausgangspflanze der Gattung *Tagetes*.

[0026] Dazu kann prinzipiell jedes Ketolase-Gen, also jede Nukleinsäuren die eine Ketolase codiert verwendet werden.

[0027] Alle in der Beschreibung erwähnten Nukleinsäuren können beispielsweise eine RNA-, DNA- oder cDNA-Sequenz sein.

[0028] Bei genomischen Ketolase-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall das die Wirtspflanze der Gattung *Tagetes* nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechenden Ketolase zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

[0029] Beispiele für Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase und die entsprechenden Ketolasen, die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden können sind beispielsweise Sequenzen aus

*Haematococcus pluvialis*, insbesondere aus *Haematococcus pluvialis* Flotow em. Wille (Accession NO: X86782; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 1, Protein SEQ ID NO: 2),

*Haematococcus pluvialis*, NIES-144 (Accession NO: D45881; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 3, Protein SEQ ID NO: 4),

*Agrobacterium aurantiacum* (Accession NO: D58420; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 5, Protein SEQ ID NO: 6),

*Alicyobacterium spec.* (Accession NOD58422; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 7, Protein SEQ ID NO: 8),

*Paracoccus marcusii* (Accession NO: Y15112; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 9, Protein SEQ ID NO: 10).

*Synechocystis* sp. Strain PC6803 (Accession NO: NP442491; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 11, Protein SEQ ID NO: 12).

*Bradyrhizobium* sp. (Accession NO: AF218415; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 13, Protein SEQ ID NO: 14).

*Nostoc* sp. Strain PCC7120 (Accession NO: AP003592, BAB74888; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 15, Protein SEQ ID NO: 16),

*Nostoc punctiforme* ATTC 29133, Nukleinsäure: Acc.-No. NZ\_AABC01000195, Basenpaar 55,604 bis 55,392 (SEQ ID NO: 81); Protein: Acc.-No. ZP\_00111258 (SEQ ID NO: 82) (als putatives Protein annotiert),

*Nostoc punctiforme* ATTC 29133, Nukleinsäure: Acc.-No. NZ\_AABC01000196, Basenpaar 140,571 bis 139,810 (SEQ ID NO: 83), Protein: (SEQ ID NO: 84) (nicht annotiert),

*Synechococcus* sp. WH 8102, Nukleinsäure: Acc.-No. NZ\_AABD01000001, Basenpaar 1,354,725-1,355,528 (SEQ ID NO: 85), Protein: Acc.-No. ZP\_00115639 (SEQ ID NO: 86) (als putatives Protein annotiert), oder *Brevundimonas aurantiaca* (WO 02079395).

[0030] Weitere natürliche Beispiele für Ketolasen und Ketolase-Gene, die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden können, lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, durch Identitätsvergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit den vorstehend beschriebenen Sequenzen und insbesondere mit den Sequenzen SEQ ID NO: 2 und/oder 16 leicht auffinden.

[0031] Weitere natürliche Beispiele für Ketolasen und Ketolase-Gene lassen sich weiterhin ausgehend von den vorstehend beschriebenen Nukleinsäuresequenzen, insbesondere ausgehend von den Sequenzen SEQ

ID NO: 2 und/oder 16 aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungstechniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

[0032] Die Hybridisierung kann unter moderaten (geringe Stringenz) oder vorzugsweise unter stringenten (hohe Stringenz) Bedingungen erfolgen.

[0033] Solche Hybridisierungsbedingungen sind beispielsweise bei Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., in: Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Seiten 9.31-9.57 oder in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6 beschrieben.

[0034] Beispielhaft können die Bedingungen während des Waschschrilles ausgewählt sein aus dem Bereich von Bedingungen begrenzt von solchen mit geringer Stringenz (mit 2X SSC bei 50\_C) und solchen mit hoher Stringenz (mit 0.2X SSC bei 50\_C, bevorzugt bei 65\_C) (20X SSC: 0,3 M Natriumcitrat, 3 M Natriumchlorid, pH 7.0).

[0035] Darüberhinaus kann die Temperatur während des Waschschrilles von moderaten Bedingungen bei Raumtemperatur, 22\_C, bis zu stringenten Bedingungen bei 65\_C angehoben werden.

[0036] Beide Parameter, Salzkonzentration und Temperatur, können gleichzeitig variiert werden, auch kann einer der beiden Parameter konstant gehalten und nur der andere variiert werden. Während der Hybridisierung können auch denaturierende Agenzien wie zum Beispiel Formamid oder SDS eingesetzt werden. In Gegenwart von 50 % Formamid wird die Hybridisierung bevorzugt bei 42\_C ausgeführt.

[0037] Einige beispielhafte Bedingungen für Hybridisierung und Waschschrille sind infolge gegeben:

(1) Hybridisierungsbedingungen mit zum Beispiel

(i) 4X SSC bei 65\_C, oder

(ii) 6X SSC bei 45\_C, oder

(iii) 6X SSC bei 68\_C, 100 mg/ml denaturierter Fischsperma-DNA, oder

(iv) 6X SSC, 0.5 % SDS, 100 mg/ml denaturierte, fragmentierte Lachssperma-DNA bei 68\_C, oder

(v) 6XSSC, 0.5 % SDS, 100 mg/ml denaturierte, fragmentierte Lachssperma-DNA, 50 Formamid bei 42\_C, oder

(vi) 50 % Formamid, 4X SSC bei 42\_C, oder

(vii) 50 % (vol/vol) Formamid, 0.1 % Rinderserumalbumin, 0.1 % Ficoll, 0.1 % Polyvinylpyrrolidon, 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 6.5, 750 mM NaCl, 75 mM Natriumcitrat bei 42\_C, oder

(viii) 2X oder 4X SSC bei 50\_C (moderate Bedingungen), oder

(ix) 30 bis 40 % Formamid, 2X oder 4X SSC bei 42\_C (moderate Bedingungen).

(2) Waschschrille für jeweils 10 Minuten mit zum Beispiel

(i) 0.015 M NaCl/0.0015 M Natriumcitrat/0.1 % SDS bei 50\_C, oder

(ii) 0.1X SSC bei 65\_C, oder

(iii) 0.1X SSC, 0.5 % SDS bei 68\_C, oder

(iv) 0.1X SSC, 0.5 % SDS, 50 % Formamid bei 42\_C, oder

(v) 0.2X SSC, 0.1 % SDS bei 42\_C, oder

(vi) 2X SSC bei 65\_C (moderate Bedingungen).

[0038] In einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen der Gattung Tagetes bringt man Nukleinsäuren ein, die ein Protein kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 %, vorzugsweise mindestens 30 %, bevorzugter mindestens 40 %, bevorzugter mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 60 %, bevorzugter mindestens 70 %, bevorzugter mindestens 80 %, besonders bevorzugt mindestens 90 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 und die enzymatische Eigenschaft einer Ketolase aufweist.

[0039] Dabei kann es sich um eine natürliche Ketolase-Sequenz handeln, die wie vorstehend beschrieben durch Identitätsvergleich der Sequenzen aus anderen Organismen gefunden werden kann oder um eine künstliche Ketolase-Sequenz die ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 2 durch künstliche Variation, beispielsweise durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgewandelt wurde.

[0040] In einer weiteren, bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahren bringt man Nukleinsäuren ein die ein Protein kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 16 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 %, vorzugsweise mindestens 30 %, bevorzugter mindestens 40 %, bevorzugter mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 60 %, bevorzugter mindestens 70 %, bevorzugter mindestens 80 %, besonders bevorzugt mindestens 90 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 16 und die enzymatische Eigenschaft einer Ketolase aufweist.

[0041] Dabei kann es sich um eine natürliche Ketolase-Sequenz handeln, die, wie vorstehend beschrieben, durch Identitätsvergleich der Sequenzen aus anderen Organismen gefunden werden kann oder um eine künstliche Ketolase-Sequenz die ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 16 durch künstliche Variation, beispiels-

weise durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgewandelt wurde.

[0042] Unter dem Begriff "Substitution" ist in der Beschreibung der Austausch einer oder mehrerer Aminosäuren durch eine oder mehrere Aminosäuren zu verstehen. Bevorzugt werden sog. konservative Austausche durchgeführt, bei denen die ersetzte Aminosäure eine ähnliche Eigenschaft hat wie die ursprüngliche Aminosäure, beispielsweise Austausch von Glu durch Asp, Gln durch Asn, Val durch Ile, Leu durch Ile, Ser durch Thr.

[0043] Deletion ist das Ersetzen einer Aminosäure durch eine direkte Bindung. Bevorzugte Positionen für Deletionen sind die Termini des Polypeptides und die Verknüpfungen zwischen den einzelnen Proteindomänen.

[0044] Insertionen sind Einfügungen von Aminosäuren in die Polypeptidkette, wobei formal eine direkte Bindung durch ein oder mehrere Aminosäuren ersetzt wird.

[0045] Unter Identität zwischen zwei Proteinen wird die Identität der Aminosäuren über die jeweils gesamte Proteinlänge verstanden, insbesondere die Identität die durch Vergleich mit Hilfe der Lasergene Software der Firma DNASTAR, inc. Madison, Wisconsin (USA) unter Anwendung der Clustal Methode (Higgins DG, Sharp PM. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. Comput Appl. Biosci. 1989 Apr;5(2):151-1) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

Multiple alignment parameter:

Gap penalty 10

Gap length penalty 10

Pairwise alignment parameter:

K-tuple 1

Gap penalty 3

Window 5

Diagonals saved 5

[0046] Unter einem Protein, das eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 oder 16 aufweist, wird dementsprechend ein Protein verstanden, das bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 oder 16, insbesondere nach obigen Programmlogarithmus mit obigem Parametersatz eine Identität von mindestens 20 % aufweist.

[0047] Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

[0048] Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der tagetesspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene von Pflanzen der Gattung *Tagetes* leicht ermitteln.

[0049] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 1 in die Pflanze der Gattung ein.

[0050] In einer weiteren, besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 15 in die Pflanze der Gattung ein.

[0051] Alle vorstehend erwähnten Ketolase-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, S. 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

[0052] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahrens verwendet man genetisch veränderte Pflanzen der Gattung *Tagetes*, die in Blüten die höchste Expressionsrate einer Ketolase aufweisen.

[0053] Vorzugsweise wird dies dadurch erreicht, daß die Genexpression der Ketolase unter Kontrolle eines blütenspezifischen Promotors erfolgt. Beispielsweise werden dazu die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren, wie nachstehend ausführlich beschrieben, in einem Nukleinsäurekonstrukt, funktionell verknüpft mit einem blütenspezifischen Promotor in die Pflanze der Gattung *Tagetes* eingebracht.

[0054] Besonders bevorzugte Pflanzen der Gattung *Tagetes* als Ausgangspflanzen oder erfindungsgemäße genetisch veränderte Pflanzen sind Pflanzen ausgewählt aus den Spezies *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, die auch als Marigold bezeichnet werden, *Tagetes lucida*, *Tagetes pringlei*, *Tagetes palmeri*, *Tagetes minuta*, *Tagetes lemmonii*, *Tagetes tenuifolia*, oder *Tagetes campanulata*, besonders bevorzugt *Tagetes erecta* oder *Tagetes patula*.

[0055] In einer bevorzugten Ausführungsform werden genetisch veränderte Pflanzen der Gattung *Tagetes* verwendet, die gegenüber dem Wildtyp zusätzlich eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und/oder  $\beta$ -Cyclase-Aktivität aufweisen.

[0056] Unter Hydroxylase-Aktivität die Enzymaktivität einer Hydroxylase verstanden.

[0057] Unter einer Hydroxylase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, am, ge-

gegebenfalls substituierten,  $\beta$ -Ionon-Ring von Carotinoiden eine Hydroxy-Gruppe einzuführen.

[0058] Insbesondere wird unter einer Hydroxylase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist,  $\beta$ -Carotin in Zeaxanthin oder Cantaxanthin in Astaxanthin umzuwandeln.

[0059] Dementsprechend wird unter Hydroxylase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Hydroxylase umgesetzte Menge  $\beta$ -Carotin oder Cantaxanthin bzw. gebildete Menge Zeaxanthin oder Astaxanthin verstanden.

[0060] Bei einer erhöhten Hydroxylase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Hydroxylase die umgesetzte Menge  $\beta$ -Carotin oder Cantaxanthin bzw. die gebildete Menge Zeaxanthin oder Astaxanthin erhöht.

[0061] Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Hydroxylase-Aktivität des Wildtyps.

[0062] Unter  $\beta$ -Cyclase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer  $\beta$ -Cyclase verstanden.

[0063] Unter einer  $\beta$ -Cyclase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, einen endständigen, linearen Rest von Lycopin in einen  $\beta$ -Ionon-Ring zu überführen.

[0064] Insbesondere wird unter einer  $\beta$ -Cyclase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist,  $\gamma$ -Carotin in  $\beta$ -Carotin umzuwandeln.

[0065] Dementsprechend wird unter  $\beta$ -Cyclase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein  $\beta$ -Cyclase umgesetzte Menge  $\gamma$ -Carotin bzw. gebildete Menge  $\beta$ -Carotin verstanden.

[0066] Bei einer erhöhten  $\beta$ -Cyclase -Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein  $\beta$ -Cyclase die umgesetzte Menge  $\gamma$ -Carotin bzw. die gebildete Menge  $\beta$ -Carotin erhöht.

[0067] Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der  $\beta$ -Cyclase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der  $\beta$ -Cyclase-Aktivität des Wildtyps.

[0068] Die Bestimmung der Hydroxylase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen: Die Aktivität der Hydroxylase wird nach Bouvier et al. (Biochim. Biophys. Acta 1391 (1998), 320-328) in vitro bestimmt. Es wird zu einer bestimmten Menge an Pflanzenextrakt Ferredoxin, Ferredoxin-NADP Oxidoreductase, Katalase, NADPH sowie  $\beta$ -Carotin mit Mono- und Digalaktosylglyzeriden zugegeben.

[0069] Besonders bevorzugt erfolgt die Bestimmung der Hydroxylase-Aktivität unter folgenden Bedingungen nach Bouvier, Keller, d'Harlingue und Camara (Xanthophyll biosynthesis: molecular and functional characterization of carotenoid hydroxylases from pepper fruits (*Capsicum annuum* L.; Biochim. Biophys. Acta 1391 (1998), 320-328):

Der in-vitro Assay wird in einem Volumen von 0.250 ml Volumen durchgeführt. Der Ansatz enthält 50 mM Kaliumphosphat (pH 7.6), 0.025 mg Ferredoxin von Spinat, 0.5 Einheiten Ferredoxin-NADP<sup>+</sup> Oxidoreduktase von Spinat, 0.25 mM NADPH, 0.010 mg  $\beta$ -Carotin (in 0.1 mg Tween 80 emulgiert), 0.05 mM einer Mischung von Mono- und Digalaktosylglyzeriden (1:1), 1 Einheit Katalase, 200 Mono- und Digalaktosylglyzeriden, (1:1), 0.2 mg Rinderserumalbumin und Pflanzenextrakt in unterschiedlichem Volumen. Die Reaktionsmischung wird 2 Stunden bei 30°C inkubiert. Die Reaktionsprodukte werden mit organischem Lösungsmittel wie Aceton oder Chloroform/Methanol (2:1) extrahiert und mittels HPLC bestimmt.

[0070] Die Bestimmung der  $\beta$ -Cyclase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

Die Aktivität der  $\beta$ -Cyclase wird nach Fraser und Sandmann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9-15) in vitro bestimmt. Es werden zu einer bestimmten Menge an Pflanzenextrakt Kaliumphosphat als Puffer (pH 7.6), Lycopin als Substrat, Stromaprotein von Paprika, NADP<sup>+</sup>, NADPH und ATP zugegeben.

[0071] Besonders bevorzugt erfolgt die Bestimmung der Hydroxylase-Aktivität unter folgenden Bedingungen nach Bouvier, d'Harlingue und Camara (Molecular Analysis of carotenoid cyclase inhibition; Arch. Biochem. Biophys. 346(1) (1997) 53-64):

Der in-vitro Assay wird in einem Volumen von 250  $\mu$ l Volumen durchgeführt. Der Ansatz enthält 50 mM Kaliumphosphat (pH 7.6), unterschiedliche Mengen an Pflanzenextrakt, 20 nM Lycopin, 250  $\mu$ g an chromoplastidärem Stromaprotein aus Paprika, 0.2 mM NADP<sup>+</sup>, 0.2 mM NADPH und 1 mM ATP. NADP/NADPH und ATP werden in 10 ml Ethanol mit 1 mg Tween 80 unmittelbar vor der Zugabe zum Inkubationsmedium gelöst. Nach einer Reaktionszeit von 60 Minuten bei 30°C wird die Reaktion durch Zugabe von Chloroform/Methanol (2:1) beendet. Die in Chloroform extrahierten Reaktionsprodukte werden mittels HPLC analysiert.

[0072] Ein alternativer Assay mit radioaktivem Substrat ist beschrieben in Fraser und Sandmann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9-15).

[0073] Die Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität und/oder  $\beta$ -Cyclase-Aktivität kann durch verschiedene Wege



erfolgen, beispielsweise durch Ausschalten von hemmenden Regulationsmechanismen auf Expressions- und Proteinebene oder durch Erhöhung der Genexpression von Nukleinsäuren kodierend eine Hydroxylase und/oder von Nukleinsäuren kodierend eine  $\beta$ -Cyclase gegenüber dem Wildtyp.

[0074] Die Erhöhung der Genexpression der Nukleinsäuren kodierend eine Hydroxylase und/oder die Erhöhung der Genexpression der Nukleinsäure kodierend eine  $\beta$ -Cyclase gegenüber dem Wildtyp kann ebenfalls durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Induzierung des Hydroxylase-Gens und/oder  $\beta$ -Cyclase-Gens durch Aktivatoren oder durch Einbringen von einer oder mehrerer Hydroxylase-Genkopien und/oder  $\beta$ -Cyclase-Genkopien, also durch Einbringen mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine Hydroxylase und/oder mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine  $\epsilon$ -Cyclase in die Pflanze der Gattung *Tagetes*.

[0075] Unter Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Hydroxylase und/oder  $\beta$ -Cyclase wird erfindungsgemäß auch die Manipulation der Expression der Pflanzen der Gattung *Tagetes* eigenen, endogenen Hydroxylase und/oder  $\beta$ -Cyclase verstanden.

[0076] Dies kann beispielsweise durch Veränderung der Promotor DNA-Sequenz für Hydroxylasen und/oder  $\beta$ -Cyclasen kodierende Gene erreicht werden. Eine solche Veränderung, die eine erhöhte Expressionsrate des Gens zur Folge hat, kann beispielsweise durch Deletion oder Insertion von DNA Sequenzen erfolgen.

[0077] Es ist, wie vorstehend beschrieben, möglich, die Expression der endogenen Hydroxylase und/oder  $\beta$ -Cyclase durch die Applikation exogener Stimuli zu verändern. Dies kann durch besondere physiologische Bedingungen, also durch die Applikation von Fremdstoffen erfolgen.

[0078] Des weiteren kann eine veränderte bzw. erhöhte Expression eines endogenen Hydroxylase- und/oder  $\beta$ -Cyclase-Gens dadurch erzielt werden, dass ein in der nicht transformierten Pflanze nicht vorkommendes Regulator-Protein mit dem Promotor dieses Gens in Wechselwirkung tritt.

[0079] Solch ein Regulator kann ein chimäres Protein darstellen, welches aus einer DNA-Bindedomäne und einer Transkriptionsaktivator-Domäne besteht, wie beispielsweise in WO 96106166 beschrieben.

[0080] In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Hydroxylase und/oder die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine  $\beta$ -Cyclase durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine Hydroxylase und/oder durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine  $\beta$ -Cyclase in die Pflanze der Gattung *Tagetes*.

[0081] Dazu kann prinzipiell jedes Hydroxylase-Gen bzw. jedes  $\beta$ -Cyclase-Gen, also jede Nukleinsäure, die eine Hydroxylase und jede Nukleinsäure, die eine  $\beta$ -Cyclase codiert, verwendet werden.

[0082] Bei genomischen Hydroxylase-bzw.  $\beta$ -Cyclase-Nukleinsäure-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall das die Wirtspflanze nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechende Hydroxylase bzw.  $\beta$ -Cyclase zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

[0083] Ein Beispiel für ein Hydroxylase-Gen ist eine Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase aus *Haemotococcus pluvialis*, Accession AX038729, WO 0061764; (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 17, Protein: SEQ ID NO: 18).

[0084] Ein Beispiel für ein  $\beta$ -Cyclase-Gen ist eine Nukleinsäure, codierend eine  $\beta$ -Cyclase aus Tomate (Accession X86452). (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 19, Protein: SEQ ID NO: 20).

[0085] In den erfindungsgemäßen bevorzugten transgenen Pflanzen der Gattung *Tagetes* liegt also in dieser bevorzugten Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres Hydroxylase-Gen und/oder  $\beta$ -Cyclase-Gen vor.

[0086] In dieser bevorzugten Ausführungsform weist die genetisch veränderte Pflanze beispielsweise mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Hydroxylase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine  $\beta$ -Cyclase oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine  $\beta$ -Cyclase auf.

[0087] Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als Hydroxylase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 18 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70%, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO: 18, und die die enzymatische Eigenschaft einer Hydroxylase aufweisen.

[0088] Weitere Beispiele für Hydroxylasen und Hydroxylase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID. NO: 18 leicht auffinden.

[0089] Weitere Beispiele für Hydroxylasen und Hydroxylase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 17 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

[0090] In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der Hydroxylase-Akti-

- vität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der Hydroxylase der Sequenz SEQ ID NO: 18.
- [0091] Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.
- [0092] Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.
- [0093] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO: 17 in den Organismus ein.
- [0094] Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als  $\beta$ -Cyclase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 20 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70 %, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 20, und die die enzymatische Eigenschaft einer  $\beta$ -Cyclase aufweisen.
- [0095] Weitere Beispiele für  $\beta$ -Cyclasen und  $\beta$ -Cyclase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der SEQ ID NO: 20 leicht auffinden.
- [0096] Weitere Beispiele für  $\beta$ -Cyclasen und  $\beta$ -Cyclase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 19 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.
- [0097] In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der  $\beta$ -Cyclase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der  $\beta$ -Cyclase der Sequenz SEQ. ID. NO: 20.
- [0098] Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.
- [0099] Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.
- [0100] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO: 19 in den Organismus ein.
- [0101] Alle vorstehend erwähnten Hydroxylase-Gene oder  $\beta$ -Cyclase-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappenden, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoramiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.
- [0102] In einer weiter bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens weisen die Pflanzen der Gattung Tagetes gegenüber dem Wildtyp zusätzlich eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität auf.
- [0103] Unter  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer  $\epsilon$ -Cyclase verstanden.
- [0104] Unter einer  $\epsilon$ -Cyclase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, einen endständigen, linearen Rest von Lycopin in einen  $\epsilon$ -Ionon-Ring zu überführen.
- [0105] Unter einer  $\epsilon$ -Cyclase wird daher insbesondere ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Lycopin in  $\delta$ -Carotin umzuwandeln.
- [0106] Dementsprechend wird unter  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein  $\epsilon$ -Cyclase umgesetzte Menge Lycopin bzw. gebildete Menge  $\delta$ -Carotin verstanden.
- [0107] Bei einer reduzierten  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein  $\epsilon$ -Cyclase die umgesetzte Menge Lycopin bzw. die gebildete Menge  $\delta$ -Carotin reduziert.
- [0108] Unter einer reduzierten  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität wird vorzugsweise die teilweise oder im wesentlichen vollständige, auf unterschiedliche zellbiologische Mechanismen beruhende Unterbindung oder Blockierung der Funktionalität einer  $\epsilon$ -Cyclase in einer pflanzlichen Zelle, Pflanze oder einem davon abgeleiteten Teil, Gewebe, Organ, Zellen oder Samen verstanden.
- [0109] Die Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität in Pflanzen gegenüber dem Wildtyp kann beispielsweise durch Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Proteinmenge, oder der  $\epsilon$ -Cyclase-mRNA-Menge in der Pflanze erfolgen. Dementsprechend kann eine gegenüber dem Wildtyp reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität direkt bestimmt werden oder über die Bestimmung der  $\epsilon$ -Cyclase-Proteinmenge oder der  $\epsilon$ -Cyclase-mRNA-Menge der erfindungsge-

mäßen Pflanze im Vergleich zum Wildtyp erfolgen.

[0110] Eine Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität umfasst eine mengenmäßige Verringerung einer  $\epsilon$ -Cyclase bis hin zu einem im wesentlichen vollständigen Fehlen der  $\epsilon$ -Cyclase (d.h. fehlende Nachweisbarkeit von  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität oder fehlende immunologische Nachweisbarkeit der  $\epsilon$ -Cyclase). Vorzugsweise wird die  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität (bzw. die  $\epsilon$ -Cyclase-Proteinmenge oder die  $\epsilon$ -Cyclase-mRNA-Menge) in der Pflanze, besonders bevorzugt in Blüten im Vergleich zum Wildtyp um mindestens 5 %, weiter bevorzugt um mindestens 20 %, weiter bevorzugt um mindestens 50 %, weiter bevorzugt um 100 % reduziert. Insbesondere meint "Reduzierung" auch das vollständigen Fehlen der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität (bzw. des  $\epsilon$ -Cyclase-Proteins oder der  $\epsilon$ -Cyclase-mRNA).

[0111] Die Bestimmung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen: Die  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität kann nach Fraser und Sandmann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9-15) in vitro bestimmt werden, wenn zu einer bestimmten Menge an Pflanzenextrakt Kaliumphosphat als Puffer (pH 7.6), Lycopin als Substrat, Stromaprotein von Paprika, NADP<sup>+</sup>, NADPH und ATP zugegeben werden.

[0112] Die Bestimmung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt besonders bevorzugt nach Bouvier, d'Harlingue und Camara (Molecular Analysis of carotenoid cyclase inhibition; Arch. Biochem. Biophys. 346(1) (1997) 53-64):

Der in-vitro Assay wird in einem Volumen von 0.25 ml durchgeführt. Der Ansatz enthält 50 mM Kaliumphosphat (pH 7.6), unterschiedliche Mengen an Pflanzenextrakt, 20 nM Lycopin, 0.25 mg an chromoplastidärem Stromaprotein aus Paprika, 0.2 mM NADP<sup>+</sup>, 0.2 mM NADPH und 1 mM ATP. NADP/NADPH und ATP werden in 0.09 ml Ethanol mit 1 mg Tween 80 unmittelbar vor der Zugabe zum Inkubationsmedium gelöst. Nach einer Reaktionszeit von 60 Minuten bei 30°C wird die Reaktion durch Zugabe von Chloroform/Methanol (2:1) beendet. Die in Chloroform extrahierten Reaktionsprodukte werden mittels HPLC analysiert.

[0113] Ein alternativer Assay mit radioaktivem Substrat ist beschrieben in Fraser und Sandmann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9-15). Eine weitere analytische Methode ist beschrieben in Beyer, Kröncke und Nievelstein (On the mechanism of the lycopene isomerase/cyclase reaction in *Narcissus pseudonarcissus* L. chromoplast; J. Biol. Chem. 266(26) (1991) 17072-17078).

[0114] Vorzugsweise erfolgt die Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität in Pflanzen durch mindestens eines der nachfolgenden Verfahren:

- a) Einbringen mindestens einer doppelsträngigen  $\epsilon$ -Cyclase Ribonukleinsäuresequenz, nachstehend auch  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA genannt, oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten. Umfasst sind solche Verfahren, bei denen die  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA gegen ein  $\epsilon$ -Cyclase-Gen (also genomische DNA-Sequenzen wie die Promotorsequenz) oder ein  $\epsilon$ -Cyclase-Transkript (also mRNA-Sequenzen) gerichtet ist,
- b) Einbringen mindestens einer  $\epsilon$ -Cyclase antisense-Ribonukleinsäuresequenz, nachstehend auch  $\epsilon$ -Cyclase-antisenseRNA genannt, oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette. Umfasst sind solche Verfahren, bei denen die  $\epsilon$ -Cyclase-antisenseRNA gegen ein  $\epsilon$ -Cyclase-Gen (also genomische DNA-Sequenzen) oder ein  $\epsilon$ -Cyclase-Gentranskript (also RNA-Sequenzen) gerichtet ist. Umfasst sind auch  $\alpha$ -anomere Nukleinsäuresequenzen,
- c) Einbringen mindestens einer  $\epsilon$ -Cyclase-antisenseRNA kombiniert mit einem Ribozym oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette
- d) Einbringen mindestens einer  $\epsilon$ -Cyclase sense-Ribonukleinsäuresequenz, nachstehend auch  $\epsilon$ -Cyclase-senseRNA genannt, zur Induktion einer Kosuppression oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette
- e) Einbringen mindestens eines DNA- oder Protein-bindenden Faktors gegen ein  $\epsilon$ -Cyclase-Gen, -RNA oder -Protein oder einer dessen Expression gewährleistenden Expressionskassette
- f) Einbringen mindestens einer den  $\epsilon$ -Cyclase RNA-Abbau bewirkenden viralen Nukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette
- g) Einbringen mindestens eines Konstruktes zur Erzeugung eines Funktionsverlustes, wie beispielsweise die Generierung von Stopp-Kodons oder eine Verschiebungen im Leseraster, an einem  $\epsilon$ -Cyclase-Gen beispielsweise durch Erzeugung einer Insertion, Deletion, Inversion oder Mutation in einem  $\epsilon$ -Cyclase-Gen. Bevorzugt können Knockout-Mutanten mittels gezielter Insertion in besagtes  $\epsilon$ -Cyclase-Gen durch homologe Rekombination oder Einbringen von sequenzspezifischen Nukleasen gegen  $\epsilon$ -Cyclase-Gensequenzen generiert werden.

[0115] Dem Fachmann ist bekannt, dass auch weitere Verfahren im Rahmen der vorliegenden Erfindung zur Verminderung einer  $\epsilon$ -Cyclase bzw. seiner Aktivität oder Funktion eingesetzt werden können. Beispielsweise kann auch das Einbringen einer dominant-negativen Variante einer  $\epsilon$ -Cyclase oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette vorteilhaft sein. Dabei kann jedes einzelne dieser Verfahren eine Verminderung der Proteinmenge, mRNA-Menge und/oder Aktivität einer  $\epsilon$ -Cyclase bewirken. Auch eine kombinierte

Anwendung ist denkbar. Weitere Methoden sind dem Fachmann bekannt und können die Behinderung oder Unterbindung der Prozessierung der  $\epsilon$ -Cyclase, des Transports der  $\epsilon$ -Cyclase oder dessen mRNA, Hemmung der Ribosomenanlagerung, Hemmung des RNA-Spleißens, Induktion eines  $\epsilon$ -Cyclase-RNA abbauenden Enzyms und/oder Hemmung der Translationselongation oder -termination umfassen.

[0116] Die einzelnen bevorzugten Verfahren seien infolge durch beispielhafte Ausführungsformen beschrieben:

a) Einbringen einer doppelsträngigen  $\epsilon$ -Cyclase-Ribonukleinsäuresequenz ( $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA)

[0117] Das Verfahren der Genregulation mittels doppelsträngiger RNA ("double-stranded RNA interference"; dsRNAi) ist bekannt und beispielsweise in Matzke MA et al. (2000) Plant Mol Biol 43:401-415; Fire A. et al (1998) Nature 391:806-811; WO 99132619; WO 99153050; WO 00/68374; WO 00144914; WO 00/44895; WO 00/49035 oder WO 00/63364 beschrieben. Auf die in den angegebenen Zitaten beschriebenen Verfahren und Methoden wird hiermit ausdrücklich Bezug genommen.

[0118] Unter "Doppelsträngiger Ribonukleinsäuresequenz" wird erfindungsgemäß eine oder mehr Ribonukleinsäuresequenzen, die aufgrund komplementärer Sequenzen theoretisch, beispielsweise gemäß den Basenpaarregeln von Waston und Crick und/oder faktisch, beispielsweise aufgrund von Hybridisierungsexperimenten, in vitro und/oder in vivo in der Lage sind, doppelsträngige RNA-Strukturen auszubilden.

[0119] Dem Fachmann ist bewusst, dass die Ausbildung von doppelsträngigen RNA-Strukturen, einen Gleichgewichtszustand darstellt. Bevorzugt ist das Verhältnis von doppelsträngigen Molekülen zu entsprechenden dissoziierten Formen mindestens 1 zu 10, bevorzugt 1:1, besonders bevorzugt 5:1, am meisten bevorzugt 10:1.

[0120] Unter einer doppelsträngigen  $\epsilon$ -Cyclase-Ribonukleinsäuresequenz oder auch  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA wird vorzugsweise ein RNA-Molekül verstanden, das einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz enthält, die

- a) mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Transkripts identisch ist und/oder
- b) mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor-Sequenz identisch ist.

[0121] Im erfindungsgemäßen Verfahren bringt man daher zur Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität bevorzugt in die Pflanze eine RNA ein, die einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz enthält, die

- a) mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Transkripts identisch ist und/oder
- b) mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor-Sequenz identisch ist.

[0122] Unter dem Begriff " $\epsilon$ -Cyclase-Transkript" wird der transkribierte Teil eines  $\epsilon$ -Cyclase-Gens verstanden, der neben der  $\epsilon$ -Cyclase kodierenden Sequenz beispielsweise auch nichtkodierende Sequenzen, wie beispielsweise auch UTRs enthält.

[0123] Unter einer RNA, die "mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor-Sequenz identisch ist", ist vorzugsweise gemeint, dass die RNA-Sequenz mit mindestens einem Teil des theoretischen Transkriptes der  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor-Sequenz, also der entsprechenden RNA-Sequenz, identisch ist.

[0124] Unter "einem Teil" des Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Transkripts bzw. der Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor-Sequenz werden Teilsequenzen verstanden, die von wenigen Basenpaaren bis hin zu vollständigen Sequenzen des Transkripts bzw. der Promotorsequenz reichen können. Die optimale Länger der Teilsequenzen kann der Fachmann durch Routineversuche leicht ermitteln.

[0125] In der Regel beträgt die Länge der Teilsequenzen mindestens 10 Basen und höchstens 2 kb, bevorzugt mindestens 25 Basen und höchstens 1,5 kb, besonders bevorzugt mindestens 50 Basen und höchstens 600 Basen, ganz besonders bevorzugt mindestens 100 Basen und höchstens 500, am meisten bevorzugt mindestens 200 Basen oder mindestens 300 Basen und höchstens 400 Basen.

[0126] Vorzugsweise werden die Teilsequenzen so ausgesucht, dass eine möglichst hohe Spezifität erreicht wird und nicht Aktivitäten anderer Enzyme reduziert werden, deren Verminderung nicht erwünscht ist. Es ist daher vorteilhaft für die Teilsequenzen der  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA Teile des  $\epsilon$ -Cyclase Transkripts und/oder Teilsequenzen der  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor-Sequenzen zu wählen, die nicht in anderen Aktivitäten auftreten.

[0127] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform enthält daher die  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA eine Sequenz, die mit einem Teil der Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Transkripts identisch ist und das 5'-Ende oder das 3'-Ende der Pflanze eigenen Nukleinsäure, codierend eine  $\epsilon$ -Cyclase enthält. Insbesondere sind nichttranslatierte Bereiche im 5' oder 3' des Transkriptes geeignet, selektive Doppel-Strang-Strukturen herzustellen.

[0128] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung bezieht sich auf doppelsträngige RNA-Moleküle (dsRNA-Moleküle), die bei Einbringen in einen pflanzlichen Organismus (oder eine davon abgeleitete Zelle, Gewebe, Organ oder Vermehrungsmaterial) die Verminderung einer  $\epsilon$ -Cyclase bewirken.

[0129] Ein doppelsträngige RNA-Molekül zur Reduzierung der Expression einer  $\epsilon$ -Cyclase ( $\epsilon$ -Cyclase-dsR-

NA) umfasst dabei bevorzugt

- a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil eines "sense"-RNA- $\epsilon$ -Cyclase Transkriptes, und
- b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen, bevorzugt vollständig, komplementären ist.

[0130] Zur Transformation der Pflanze mit einer  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA wird bevorzugt ein Nukleinsäurekonstrukt verwendet, das in die Pflanze eingebracht wird und das in der Pflanze in die  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA transkribiert wird.

[0131] Daher betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Nukleinsäurekonstrukt, transkribierbar in

- a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA- $\epsilon$ -Cyclase Transkriptes, und
- b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-sense-Strang unter a) im wesentlichen – bevorzugt vollständig – komplementär ist.

[0132] Diese Nukleinsäurekonstrukte werden im folgenden auch Expressionskassetten oder Expressionsvektoren genannt.

[0133] In Bezug auf die dsRNA-Moleküle wird unter  $\epsilon$ -Cyclase-Nukleinsäuresequenz, bzw. das entsprechende Transkript bevorzugt die Sequenz gemäß SEQ ID NO: 38 oder ein Teil derselben verstanden.

[0134] "Im wesentlichen identisch" meint, dass die dsRNA Sequenz auch Insertionen, Deletionen sowie einzelne Punktmutationen im Vergleich zu der  $\epsilon$ -Cyclase Zielsequenz aufweisen kann und dennoch eine effizient Verminderung der Expression bewirkt. Bevorzugt beträgt die Homologie mindestens 75 %, bevorzugt mindestens 80 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 90 % am meisten bevorzugt 100 % zwischen dem "sense"-Strang einer inhibitorischen dsRNA und mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes eines  $\epsilon$ -Cyclase-Gens, bzw. zwischen dem "antisense"-Strang dem komplementären Strang eines  $\epsilon$ -Cyclase-Gens.

[0135] Eine 100%ige Sequenzidentität zwischen dsRNA und einem  $\epsilon$ -Cyclase Gentranskript ist nicht zwingend erforderlich, um eine effiziente Verminderung der  $\epsilon$ -Cyclase Expression zu bewirken. Demzufolge besteht der Vorteil, dass das Verfahren tolerant ist gegenüber Sequenzabweichungen, wie sie infolge genetischer Mutationen, Polymorphismen oder evolutionärer Divergenzen vorliegen können. So ist es beispielsweise möglich mit der dsRNA, die ausgehend von der  $\epsilon$ -Cyclase Sequenz des einen Organismus generiert wurde, die  $\epsilon$ -Cyclase Expression in einem anderen Organismus zu unterdrücken. Zu diesem Zweck umfasst die dsRNA bevorzugt Sequenzbereiche von  $\epsilon$ -Cyclase-Gentranskripten, die konservierten Bereichen entsprechen. Besagte konservierte Bereiche können aus Sequenzvergleichen leicht abgeleitet werden.

[0136] Alternativ, kann eine "im wesentlichen identische" dsRNA auch als Nukleinsäuresequenz definiert werden, die befähigt ist, mit einem Teil eines  $\epsilon$ -Cyclase Gentranskriptes zu hybridisieren (z.B. in 400 mM NaCl, 40 mM PIPES pH 6,4, 1 mM EDTA bei 50°C oder 70°C für 12 bis 16 h).

[0137] "Im wesentlichen komplementär" meint, dass der "antisense"-RNA-Strang auch Insertionen, Deletionen sowie einzelne Punktmutationen im Vergleich zu dem Komplement des "sense"-RNA-Stranges aufweisen kann. Bevorzugt beträgt die Homologie mindestens 80 %, bevorzugt mindestens 90 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 95 %, am meisten bevorzugt 100 % zwischen dem "antisense"-RNA-Strang und dem Komplement des "sense"-RNA-Stranges.

[0138] In einer weiteren Ausführungsform umfasst die  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA

- a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes des Promotorbereichs eines  $\epsilon$ -Cyclase-Gens, und
- b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen – bevorzugt vollständig – komplementären ist.

[0139] Das entsprechende, bevorzugt zur Transformation der Pflanzen zu verwendende, Nukleinsäurekonstrukt, umfasst

- a) einen "sense"-DNA-Strang der im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des Promotorbereichs eines  $\epsilon$ -Cyclase-Gens, und
- b) einen "antisense"-DNA-Strang, der zu dem DNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen – bevorzugt vollständig – komplementär ist.

[0140] Vorzugsweise wird unter dem Promotorbereich einer  $\epsilon$ -Cyclase eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 47 oder ein Teil der selben verstanden.

[0141] Zur Herstellung der  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA-Sequenzen zur Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität werden, insbesondere für *Tagetes erecta*, besonders bevorzugt die folgenden Teil-Sequenzen verwendet:

SEQ ID NO: 40: Sense-Fragment der 5'terminalen Region der  $\epsilon$ -Cyclase

SEQ ID NO: 41: Antisense-Fragment der 5'terminalen Region der  $\epsilon$ -Cyclase

SEQ ID NO: 42: Sense-Fragment der 3'terminalen Region der  $\epsilon$ -Cyclase

SEQ ID NO: 43: Antisense-Fragment der 3'terminalen Region der  $\epsilon$ -Cyclase

SEQ ID NO: 47: Sense-Fragment des  $\epsilon$ -Cyclase-Promotors

SEQ ID NO: 48: Antisense-Fragment des  $\epsilon$ -Cyclase-Promotors

[0142] Die dsRNA kann aus einem oder mehr Strängen von Polyribonukleotiden bestehen. Natürlich können, um den gleichen Zweck zu erreichen, auch mehrere individuelle dsRNA Moleküle, die jeweils einen der oben definierten Ribonukleotidsequenzabschnitte umfassen, in die Zelle oder den Organismus eingebracht werden.

[0143] Die doppelsirängige dsRNA-Struktur kann ausgehend von zwei komplementären, separaten RNA-Strängen oder – bevorzugt – ausgehend von einem einzelnen, selbstkomplementären RNA-Strang gebildet werden. In diesem Fall sind "sense"-RNA-Strang und "antisense"-RNA-Strang bevorzugt kovalent in Form eines invertierten "Repeats" miteinander verbunden.

[0144] Wie z. B. in WO 99/53050 beschrieben, kann die dsRNA auch eine Haarnadelstruktur umfassen, indem "sense"- und "antisense"-Strang durch eine verbindende Sequenz ("Linker"; beispielsweise ein Intron) verbunden werden. Die selbstkomplementären dsRNA-Strukturen sind bevorzugt, da sie lediglich die Expression einer RNA-Sequenz erfordern und die komplementären RNA-Stränge stets in einem äquimolaren Verhältnis umfassen. Bevorzugt ist die verbindende Sequenz ein Intron (z. B. ein Intron des ST-LS1 Gens aus Kartoffel; Vancanneyt GF et al. (1990) Mol Gen Genet 220(2):245-250).

[0145] Die Nukleinsäuresequenz kodierend für eine dsRNA kann weitere Elemente beinhalten, wie beispielsweise Transkriptionsterminationssignale oder Polyadenylierungssignale.

[0146] Ist die dsRNA jedoch gegen die Promotorsequenz einer  $\epsilon$ -Cyclase gerichtet, so umfasst sie bevorzugt keine Transkriptionsterminationssignale oder Polyadenylierungssignale. Dies ermöglicht eine Retention der dsRNA im Nukleus der Zelle und verhindert eine Verteilung der dsRNA in der gesamten Pflanze "Spreading").

[0147] Sollen die zwei Stränge der dsRNA in einer Zelle oder Pflanze zusammengebracht werden, so kann dies beispielhaft auf folgende Art geschehen:

- a) Transformation der Zelle oder Pflanze mit einem Vektor, der beide Expressionskassetten umfasst,
- b) Kotretransformation der Zelle oder Pflanze mit zwei Vektoren, wobei der eine die Expressionskassetten mit dem "sense"-Strang, der andere die Expressionskassetten mit dem "antisense"-Strang umfasst.
- c) Kreuzung von zwei individuellen Pflanzenlinien, wobei die eine die Expressionskassetten mit dem "sense"-Strang, die andere die Expressionskassetten mit dem "antisense"-Strang umfasst.

[0148] Die Bildung der RNA Duplex kann entweder außerhalb der Zelle oder innerhalb derselben initiiert werden.

[0149] Die dsRNA kann entweder in vivo oder in vitro synthetisiert werden. Dazu kann eine DNA-Sequenz kodierend für eine dsRNA in eine Expressionskassette unter Kontrolle mindestens eines genetischen Kontrollelementes (wie beispielsweise einem Promotor) gebracht werden. Eine Polyadenylierung ist nicht erforderlich, ebenso müssen keine Elemente zur Initiierung einer Translation vorhanden sein. Bevorzugt ist die Expressionskassette für die MP-dsRNA auf dem Transformationskonstrukt oder dem Transformationsvektor enthalten.

[0150] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Expression der dsRNA ausgehend von einem Expressionskonstrukt unter funktioneller Kontrolle eines blütenspezifischen Promotors, besonders bevorzugt unter der Kontrolle des Promotors beschrieben durch SEQ ID NO: 28 oder eines funktionell äquivalenten Teils desselben.

[0151] Die Expressionskassetten kodierend für den "antisense"- und/oder den "sense"-Strang einer  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA oder für den selbstkomplementären-Strang der dsRNA, werden dazu bevorzugt in einen Transformationsvektor inseriert und mit den unten beschriebenen Verfahren in die pflanzliche Zelle eingebracht. Für das erfindungsgemäße Verfahren ist eine stabile Insertion in das Genom vorteilhaft.

[0152] Die dsRNA kann in einer Menge eingeführt werden, die zumindest eine Kopie pro Zelle ermöglicht. Höhere Mengen (z. B. mindestens 5, 10, 100, 500 oder 1000 Kopien pro Zelle) können ggf. eine effizienter Verminderung bewirken.

#### b) Einbringen einer antisense-Ribonukleinsäuresequenz einer $\epsilon$ -Cyclase ( $\epsilon$ -Cyclase-antisenseRNA)

[0153] Verfahren zur Verminderung eines bestimmten Proteins durch die "antisense"-Technologie sind vielfach – auch in Pflanzen – beschrieben (Sheehy et al. (1988) Proc Natl Acad Sci USA 85: 8805-8809; US 4,801,340; Mol JN et al. (1990) FEBS Lett 268(2):427-430). Das antisense Nukleinsäuremolekül hybridisiert bzw. bindet mit der zellulären mRNA und/oder genomischen DNA kodierend für das zu verminderte  $\epsilon$ -Cyclase. Dadurch wird die Transkription und/oder Translation der  $\epsilon$ -Cyclase unterdrückt. Die Hybridisierung kann auf konventionelle Art über die Bildung einer stabilen Duplex oder – im Fall von genomischer DNA – durch Bindung des antisense Nukleinsäuremoleküls mit der Duplex der genomischen DNA durch spezifische Wechselwirkung in der großen Furche der DNA-Helix entstehen.

[0154] Eine  $\epsilon$ -Cyclase-antisenseRNA kann unter Verwendung der für diese  $\epsilon$ -Cyclase kodierenden Nukleinsäuresequenz, beispielsweise der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 38 nach den Basenpaarregeln von Watson und Crick abgeleitet werden. Die  $\epsilon$ -Cyclase-antisenseRNA kann zu der gesamten transkribierten mRNA der  $\epsilon$ -Cyclase komplementär sein, sich auf die kodierende Region beschränken oder nur aus einem Oligonukleotid bestehen, das zu einem Teil der kodierenden oder nicht-kodierenden Sequenz der mRNA komplementär ist. So kann das Oligonukleotid beispielsweise komplementär zu der Region sein, die den Translationsstart für die  $\epsilon$ -Cyclase umfasst. Die  $\epsilon$ -Cyclase-antisenseRNA kann eine Länge von zum Beispiel 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 oder 50 Nukleotide haben, kann aber auch länger sein und mindestens 100, 200, 500, 1000, 2000 oder 5000 Nukleotide umfassen.  $\epsilon$ -Cyclase-antisenseRNAs werden im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens bevorzugt rekombinant in der Zielzelle exprimiert.

[0155] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Expression der antisenseRNA ausgehend von einem Expressionskonstrukt unter funktioneller Kontrolle eines blütenspezifischen Promotors, besonders bevorzugt unter der Kontrolle des Promotors beschrieben durch SEQ ID NO: 28 oder eines funktionell äquivalenten Teils desselben.

[0156] Besagte Expressionskassetten können Teil eines Transformationskonstruktes oder Transformationsvektors sein, oder aber auch im Rahmen einer Kotransformation eingeführt werden.

[0157] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kann die Expression einer  $\epsilon$ -Cyclase durch Nukleotidsequenzen inhibiert werden, die komplementär zu der regulatorischen Region eines  $\epsilon$ -Cyclase-Gens (z.B. einem  $\epsilon$ -Cyclase Promoter und/oder Enhancer) sind und triplehelikale Strukturen mit der dortigen DNA-Doppelhelix ausbilden, so dass die Transkription des  $\epsilon$ -Cyclase-Gens reduziert wird. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (Helene C (1991) *Anticancer Drug Res* 6(6):569-84; Helene C et al. (1992) *Ann NY Acad Sci* 660:27-36; Maher LJ (1992) *Bioassays* 14(12):807-815).

[0158] In einer weiteren Ausführungsform kann die  $\epsilon$ -Cyclase-antisenseRNA eine  $\alpha$ -anomere Nukleinsäure sein. Derartige  $\alpha$ -anomere Nukleinsäuremoleküle bilden spezifische doppelsträngige Hybride mit komplementärer RNA in denen, – im Unterschied zu den konventionellen  $\beta$ -Nukleinsäuren – die beiden Stränge parallel zueinander verlaufen (Gautier C et al. (1987) *Nucleic Acids Res* 15:6625-6641).

#### c) Einbringen einer $\epsilon$ -Cyclase-antisenseRNA kombiniert mit einem Ribozym

[0159] Vorteilhaft kann die oben beschriebene antisense-Strategie mit einem Ribozym-Verfahren gekoppelt werden. Katalytische RNA-Moleküle oder Ribozyme können an jede beliebige Ziel-RNA angepasst werden und spalten das Phosphodiester-Gerüst an spezifischen Positionen, wodurch die Ziel-RNA funktionell deaktiviert wird (Tanner NK (1999) *FEMS Microbiol Rev* 23(3):257-275). Das Ribozym wird dadurch nicht selber modifiziert, sondern ist in der Lage, weitere Ziel-RNA-Moleküle analog zu spalten, wodurch es die Eigenschaften eines Enzyms erhält. Der Einbau von Ribozymsequenzen in "antisense"-RNAs verleiht eben diesen "antisense"-RNAs diese enzymähnliche, RNA-spaltende Eigenschaft und steigert so deren Effizienz bei der Inaktivierung der Ziel-RNA. Die Herstellung und Verwendung entsprechender Ribozym-'antisense'-RNA-Moleküle ist beschrieben (u.a. bei Haseloff et al. (1988) *Nature* 334: 585-591; Haselhoff und Gerlach (1988) *Nature* 334:585-591; Steinecke P et al. (1992) *EMBO J* 11(4):1525-1530; de Feyter R et al. (1996) *Mol Gen Genet*. 250(3):329-338).

[0160] Auf diese Art können Ribozyme (z.B. "Hammerhead"-Ribozyme; Haselhoff und Gerlach (1988) *Nature* 334:585-591) verwendet werden, um die mRNA eines zu vermindernden  $\epsilon$ -Cyclases katalytisch zu spalten und so die Translation zu verhindern. Die Ribozym-Technologie kann die Effizienz einer antisense-Strategie erhöhen. Verfahren zur Expression von Ribozymen zur Verminderung bestimmter Proteine sind beschrieben in (EP 0 291 533, EP 0 321 201, EP 0 360 257). In pflanzlichen Zellen ist eine Ribozym-Expression ebenfalls beschrieben (Steinecke P et al. (1992) *EMBO J* 11(4):1525-1530; de Feyter R et al. (1996) *Mol Gen Genet*. 250(3):329-338). Geeignete Zielsequenzen und Ribozyme können zum Beispiel wie bei "Steinecke P, Ribozymes, *Methods in Cell Biology* 50, Galbraith et al. eds, Academic Press, Inc. (1995), S. 449-460" beschrieben, durch Sekundärstrukturberechnungen von Ribozym- und Ziel-RNA sowie durch deren Interaktion bestimmt werden (Bayley CC et al. (1992) *Plant Mol Biol*. 18(2):353-361; Lloyd AM and Davis RW et al. (1994) *Mol Gen Genet*. 242(6):653-657). Beispielsweise können Derivate der Tetrahymena L-19 IVS RNA konstruiert werden, die komplementäre Bereiche zu der mRNA des zu supprimierenden  $\epsilon$ -Cyclases aufweisen (siehe auch US 4,987,071 und US 5,116,742). Alternativ können solche Ribozyme auch über einen Selektionsprozess aus einer Bibliothek diverser Ribozyme identifiziert werden (Bartel D und Szostak JW (1993) *Science* 261:1411-1418).

#### d) Einbringen einer sense-Ribonukleinsäuresequenz einer $\epsilon$ -Cyclase ( $\epsilon$ -CyclasesenseRNA) zur Induktion einer Kosuppression

[0161] Die Expression einer  $\epsilon$ -Cyclase Ribonukleinsäuresequenz (oder eines Teils derselben) in sense-Ori-



entierung kann zu einer Kosuppression des entsprechenden  $\epsilon$ -Cyclase-Gens führen. Die Expression von sense-RNA mit Homologie zu einem endogenen  $\epsilon$ -Cyclasegen kann die Expression desselben vermindern oder ausschalten, ähnlich wie es für antisense Ansätze beschrieben wurde (Jorgensen et al. (1996) *Plant Mol Biol* 31(5):957-973; Goring et al. (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88:1770-1774; Smith et al. (1990) *Mol Gen Genet* 224:447-481; Napoli et al. (1990) *Plant Cell* 2:279-289; Van der Krol et al. (1990) *Plant Cell* 2:291-99). Dabei kann das eingeführte Konstrukt das zu vermindern, homologe Gen ganz oder nur teilweise repräsentieren. Die Möglichkeit zur Translation ist nicht erforderlich. Die Anwendung dieser Technologie auf Pflanzen ist beschrieben (z.B. Napoli et al. (1990) *Plant Cell* 2:279-289; in US 5,034,323).

[0162] Bevorzugt wird die Kosuppression unter Verwendung einer Sequenz realisiert, die im wesentlichen identisch ist zu zumindest einem Teil der Nukleinsäuresequenz kodierend für eine  $\epsilon$ -Cyclase, beispielsweise der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 38.

[0163] Bevorzugt ist die  $\epsilon$ -Cyclase-senseRNA so gewählt, dass es nicht zu einer Translation der  $\epsilon$ -Cyclase oder eines Teils desselben kommen kann. Dazu kann beispielsweise der 5'-untranslatierte oder 3'-untranslatierte Bereich gewählt oder aber das ATG-Startkodon deletiert oder mutiert werden.

#### e) Einbringen von DNA-oder Protein-bindende Faktoren gegen $\epsilon$ -Cyclase Gene, -RNAs oder Proteine

[0164] Eine Verminderung einer  $\epsilon$ -Cyclase Expression ist auch mit spezifischen DNA-bindenden Faktoren z.B. mit Faktoren vom Typ der Zinkfingertranskriptionsfaktoren möglich. Diese Faktoren lagern sich an die genomische Sequenz des endogenen Zielgens, bevorzugt in den regulatorischen Bereichen, an und bewirken eine Verminderung der Expression. Entsprechende Verfahren zur Herstellung entsprechender Faktoren sind beschrieben (Dreier B et al. (2001) *J Biol Chem* 276(31):29466-78; Dreier B et al. (2000) *J Mol Biol* 303(4):489-502; Beerli RR et al. (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* 97 (4):1495-1500; Beerli RR et al. (2000) *J Biol Chem* 275(42):32617-32627; Segal DJ and Barbas CF 3rd. (2000) *Curr Opin Chem Biol* 4(1):34-39; Kang JS and Kim JS (2000) *J Biol Chem* 275(12):8742-8748; Beerli RR et al. (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95(25):14628-14633; Kim JS et al. (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* 94(8):3616-3620; Klug A (1999) *J Mol Biol* 293(2):215-218; Tsai SY et al. (1998) *Adv Drug Deliv Rev* 30(1-3):23-31; Mapp AK et al. (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* 97(8):3930-3935; Sharrocks AD et al. (1997) *Int J Biochem Cell Biol* 29(12):1371-1387; Zhang L et al. (2000) *J Biol Chem* 275(43):33850-33860).

[0165] Die Selektion dieser Faktoren kann unter Verwendung eines beliebigen Stückes eines  $\epsilon$ -Cyclase-Gens erfolgen. Bevorzugt liegt dieser Abschnitt im Bereich der Promotorregion. Für eine Genunterdrückung kann er aber auch im Bereich der kodierenden Exons oder Introns liegen.

[0166] Ferner können Faktoren in eine Zelle eingebracht werden, die die  $\epsilon$ -Cyclase selber inhibieren. Diese proteinbindenden Faktoren können z.B. Aptamere (Famulok M und Mayer G (1999) *Curr Top Microbiol Immunol* 243:123-36) oder Antikörper bzw. Antikörperfragmente oder einzelkettige Antikörper sein. Die Gewinnung dieser Faktoren ist beschrieben (Owen M et al. (1992) *Biotechnology (NY)* 10(7):790-794; Franken E et al. (1997) *Curr Opin Biotechnol* 8(4):411-416; Whitelam (1996) *Trend Plant Sci* 1:286-272).

#### f) Einbringen von den $\epsilon$ -Cyclase RNA-Abbau bewirkenden viralen Nukleinsäuresequenzen und Expressionskonstrukten

[0167] Die  $\epsilon$ -Cyclase Expression kann effektiv auch durch Induktion des spezifischen  $\epsilon$ -Cyclase RNA-Abbaus durch die Pflanze mit Hilfe eines viralen Expressionssystems (Amplikon; Angelt SM et al. (1999) *Plant J* 20(3):357-362) realisiert werden. Diese Systeme – auch als "VIGS" (viral induced gene silencing) bezeichnet – bringen Nukleinsäuresequenzen mit Homologie zu dem Transkript einer zu vermindern  $\epsilon$ -Cyclase mittels viraler Vektoren in die Pflanze ein. Die Transkription wird sodann – vermutlich mediiert durch pflanzliche Abwehrmechanismen gegen Viren – abgeschaltet. Entsprechende Techniken und Verfahren sind beschrieben (Ratcliff F et al. (2001) *Plant J* 25(2):237-45; Fagard M und Vaucheret H (2000) *Plant Mol Biol* 43(2-3):285-93; Anandalakshmi R et al. (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95(22):13079-84; Ruiz MT (1998) *Plant Cell* 10(6):937-46).

[0168] Bevorzugt wird die VIGS-vermittelte Verminderung unter Verwendung einer Sequenz realisiert, die im wesentlichen identisch ist zu zumindest einem Teil der Nukleinsäuresequenz kodierend für ein  $\epsilon$ -Cyclase, beispielsweise der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 1.

#### g) Einbringen von Konstrukten zur Erzeugung eines Funktionsverlustes oder einer Funktionsminderung an $\epsilon$ -Cyclase-Genen

[0169] Dem Fachmann sind zahlreiche Verfahren bekannt, wie genomische Sequenzen gezielt modifiziert werden können. Dazu zählen insbesondere Verfahren wie die Erzeugung von Knockout-Mutanten mittels gezielter homologen Rekombination z.B. durch Generierung von Stopp-Kodons, Verschiebungen im Leseraster



etc. (Hohn B und Puchta H (1999) Proc Natl Acad Sci USA 96:8321-8323) oder die gezielte Deletion oder Inversion von Sequenzen mittels z.B. sequenzspezifischer Rekombinasen oder Nukleasen (s.u.)

[0170] Die Verminderung der  $\epsilon$ -Cyclase-Menge, -Funktion und/oder -Aktivität kann auch durch eine gezielte Insertion von Nukleinsäuresequenzen (z.B. der im Rahmen der erfindungsgemäßen Verfahrens zu insertierenden Nukleinsäuresequenz) in die Sequenz kodierend für eine  $\epsilon$ -Cyclase (z.B. mittels intermolekularer homologer Rekombination) realisiert werden. Im Rahmen dieser Ausführungsform verwendet man bevorzugt ein DNA-Konstrukt, das zumindest einen Teil der Sequenz eines  $\epsilon$ -Cyclasegens oder benachbarter Sequenzen umfasst, und so mit diesen in der Zielzelle gezielt rekombinieren kann, so dass durch eine Deletion, Addition oder Substitution mindestens eines Nukleotids das  $\epsilon$ -Cyclase-Gen so verändert wird, dass die Funktionalität des  $\epsilon$ -Cyclase-Gens reduziert oder gänzlich aufgehoben wird. Die Veränderung kann auch die regulativen Elemente (z.B. den Promotor) des  $\epsilon$ -Cyclase-Gens betreffen, so dass die kodierende Sequenz unverändert bleibt, eine Expression (Transkription und/oder Translation) jedoch unterbleibt und reduziert wird. Bei der konventionellen homologen Rekombination ist die zu insertierende Sequenz an ihrem 5'- und/oder 3'-Ende von weiteren Nukleinsäuresequenzen (A' bzw. B') flankiert, die eine ausreichende Länge und Homologie zu entsprechenden Sequenzen des  $\epsilon$ -Cyclase-Gens (A bzw. B) für die Ermöglichung der homologen Rekombination aufweisen. Die Länge liegt in der Regel in einem Bereich von mehreren hundert Basen bis zu mehreren Kilobasen (Thomas KR und Capecchi MR (1987) Cell 51:503; Strepp et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95(8):4368-4373). Für die homologe Rekombination wird die pflanzliche Zelle mit dem Rekombinationskonstrukt unter Verwendung der unten beschriebenen Verfahren transformiert und erfolgreich rekombinierte Klone basierend auf der infolge inaktivierten  $\epsilon$ -Cyclase selektioniert.

[0171] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird die Effizienz der Rekombination gesteigert durch Kombination mit Verfahren, die die homologe Rekombination fördern. Solche Verfahren sind beschrieben und umfassen beispielhaft die Expression von Proteinen wie RecA oder die Behandlung mit PARP-Inhibitoren. Es konnte gezeigt werden, dass die intrachromosomale homologe Rekombination in Tabakpflanzen durch die Verwendung von PARP-Inhibitoren erhöht werden kann (Puchta H et al. (1995) Plant J 7:203-210). Durch den Einsatz dieser Inhibitoren kann die Rate der homologen Rekombination in den Rekombinationskonstrukten nach Induktion des sequenzspezifischen DNA-Doppelstrangbruchs und damit die Effizienz der Deletion der Transgensequenzen weiter erhöht werden. Verschiedene PARP Inhibitoren können dabei zum Einsatz kommen. Bevorzugt umfasst sind Inhibitoren wie 3-Aminobenzamid, 8-Hydroxy-2-methylquinazolin-4-on (NU1025), 1,11b-Dihydro-[2H]benzopyrano-[4,3,2-de]isoquinolin-3-on (GPI 6150), 5-Aminoisoquinolinon, 3,4-Dihydro-5-[4-(1-piperidinyl)butoxy]-1(2H)-isoquinolinon oder die in WO 00126192, WO 00129384, WO 00/32579, WO 00164878, WO 00168206, WO 00167734, WO 01123386 und WO 01123390 beschriebenen Substanzen.

[0172] Weitere geeignete Methoden sind die Einführung von Nonsense-Mutationen in endogene Markerprotein Gene zum Beispiel mittels Einführung von RNA/DNA-Oligonukleotiden in die Pflanze (Zhu et al. (2000) Nat Biotechnol 18(5):555-558) oder die Generierung von Knockout-Mutanten mit Hilfe von z.B. T-DNA-Mutagenese (Koncz et al., Plant Mol. Biol. 1992, 20(5):963-976). Punktmutationen können auch mittels DNA-RNA Hybriden erzeugt werden, die auch als "chimeraplasty" bekannt sind (Cole-Strauss et al. (1999) Nucl Acids Res 27(5):1323-1330; Kmiec (1999) Gene therapy American Scientist 87(3):240-247).

[0173] Die Methoden der dsRNAi, der Kosuppression mittels sense-RNA und der "VIGS" ("virus induced gene silencing") werden auch als "post-transcriptional gene silencing" (PTGS) oder transcriptional gene silencing" (TGS) bezeichnet. PTGS/TGS-Verfahren sind besonders vorteilhaft, weil die Anforderungen an die Homologie zwischen dem zu vermindernenden Markerprotein-Gen und der transgen exprimierten sense- oder dsRNA-Nukleinsäuresequenz geringer sind als beispielsweise bei einem klassischen antisense-Ansatz. So kann man unter Verwendung der Markerprotein-Nukleinsäuresequenzen aus einer Art auch die Expression von homologen Markerprotein-Proteinen in anderen Arten effektiv vermindern, ohne, dass die Isolierung und Strukturaufklärung der dort vorkommenden Markerprotein-Homologen zwingend erforderlich wäre. Dies erleichtert erheblich den Arbeitsaufwand.

[0174] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp durch:

- a) Einbringen mindestens einer doppelsträngigen  $\epsilon$ -Cyclase Ribonukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten in Pflanzen und/oder
- b) Einbringen mindestens einer  $\epsilon$ -Cyclase antisense-Ribonukleinsäuresequenzen oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette in Pflanzen.

[0175] In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp durch Einbringen mindestens einer doppelsträngigen  $\epsilon$ -Cyclase Ribonukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten in Pflanzen.

[0176] In einer bevorzugten Ausführungsform werden genetisch veränderte Pflanzen verwendet, die in Blüten die geringste Expressionsrate einer  $\epsilon$ -Cyclase aufweisen.

[0177] Dies wird bevorzugt dadurch erreicht, dass die Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität blütenspezifisch, besonders bevorzugt blütenblattspezifisch erfolgt.

[0178] In der vorstehend beschriebenen, besonders bevorzugten Ausführungsform wird dies dadurch erreicht, dass die Transkription der  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA-Sequenzen unter Kontrolle eines blütenspezifischen Promotors oder noch bevorzugter unter Kontrolle eines blütenblattspezifischen Promotors erfolgt.

[0179] Besonders bevorzugt werden die genetisch veränderten Pflanzen der Gattung *Tagetes* mit folgender Kombinationen genetischer Veränderungen verwendet:

Genetisch veränderte Pflanzen der Gattung *Tagetes*, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

genetisch veränderte Pflanzen der Gattung *Tagetes*, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität aufweisen,

genetisch veränderte Pflanzen der Gattung *Tagetes*, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität aufweisen,

genetisch veränderte Pflanzen der Gattung *Tagetes*, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität aufweisen,

genetisch veränderte Pflanzen der Gattung *Tagetes*, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität aufweisen,

genetisch veränderte Pflanzen der Gattung *Tagetes*, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität und eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität aufweisen, sowie

genetisch veränderte Pflanzen der Gattung *Tagetes*, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität und eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität aufweisen.

[0180] Die Herstellung dieser genetisch veränderten Pflanzen der Gattung *Tagetes* kann, wie nachstehend beschrieben, beispielsweise durch Einbringen einzelner Nukleinsäurekonstrukte (Expressionskassetten) oder durch Einbringen von Mehrfachkonstrukten erfolgen, die bis zu zwei, drei oder vier der beschriebenen Aktivitäten enthalten.

[0181] Im folgenden wird exemplarisch die Herstellung genetisch veränderter Pflanzen der Gattung *Tagetes* mit erhöhter oder verursachter Ketolase-Aktivität in Blütenblättern beschrieben. Die Erhöhung weiterer Aktivitäten, wie beispielsweise der Hydroxylase-Aktivität und/oder der  $\beta$ -Cyclase-Aktivität kann analog unter Verwendung von Nukleinsäuresequenzen kodierend eine Hydroxylase bzw.  $\beta$ -Cyclase anstelle von Nukleinsäuresequenzen kodierend eine Ketolase erfolgen. Die Reduzierung weiterer Aktivitäten, wie beispielsweise die Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität kann analog unter Verwendung von anti- $\epsilon$ -Cyclase-Nukleinsäuresequenzen oder  $\epsilon$ -Cyclase-Inverted-Repaet-Nukleinsäuresequenz anstelle von Nukleinsäuresequenzen kodierend eine Ketolase erfolgen. Die Transformation kann bei den Kombinationen von genetischen Veränderungen einzeln oder durch Mehrfachkonstrukte erfolgen.

[0182] Die Herstellung der transgenen Pflanzen der Gattung *Tagetes* erfolgt vorzugsweise durch Transformation der Ausgangspflanzen, mit einem Nukleinsäurekonstrukt, das die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren codierend eine Ketolase enthält, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten.

[0183] Diese Nukleinsäurekonstrukte, in denen die kodierende Nukleinsäuresequenz mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten, werden im folgenden auch Expressionskassetten genannt.

[0184] Vorzugsweise enthalten die Regulationssignale einen oder mehrere Promotoren, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten.

[0185] Die Expressionskassetten beinhalten Regulationssignale, also regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfasst eine Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der kodierenden Sequenz, einen Promotor und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für mindestens eines der vorstehend beschriebenen Gene operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulativer Elemente derart, das jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann.

[0186] Im folgenden werden beispielhaft die bevorzugten Nukleinsäurekonstrukte, Expressionskassetten und Vektoren für Pflanzen der Gattung *Tagetes* und Verfahren zur Herstellung von transgenen Pflanzen der Gattung *Tagetes*, sowie die transgenen Pflanzen der Gattung *Tagetes* selbst beschrieben.

[0187] Die zur operativen Verknüpfung bevorzugten aber nicht darauf beschränkten Sequenzen sind Targe-

ting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation im Apoplasten, in der Vakuole, in Plastiden, im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (ER), im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten und Translationsverstärker wie die 5'-Führungssequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987), 8693-8711).

[0188] Als Promotoren der Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Pflanzen steuern kann.

[0189] "Konstitutiver" Promotor meint solche Promotoren, die eine Expression in zahlreichen, bevorzugt allen, Geweben über einen größeren Zeitraum der Pflanzenentwicklung, bevorzugt zu allen Zeitpunkten der Pflanzenentwicklung, gewährleisten.

[0190] Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der Promotor des 35S-Transkriptes des CaMV Blumenkohlmosaikvirus (Franck et al. (1980) Cell 21:285-294; Odell et al. (1985) Nature 313:810-812; Shewmaker et al. (1985) Virology 140:281-288; Gardner et al. (1986) Plant Mol Biol 6:221-228) oder der 19S CaMV Promotor (US 5,352,605; WO 84/02913; Benfey et al. (1989) EMBO J 8:2195-2202).

[0191] Ein weiterer geeigneter konstitutiver Promotor ist der pds Promoter (Pecker et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4962-4966) oder der "Rubisco small subunit (SSU)"-Promotor (US 4,962,028), der LeguminB-Promotor (GenBank Acc.-Nr. X03677), der Promotor der Nopalinsynthase aus Agrobacterium, der TR-Doppelpromotor, der OCS (Octopin Synthase) Promotor aus Agrobacterium, der Ubiquitin Promotor (Holtorf S et al. (1995) Plant Mol Biol 29:637-649), den Ubiquitin 1 Promotor (Christensen et al. (1992) Plant Mol Biol 18:675-689; Bruce et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:9692-9696), den Smas Promotor, den Cinnamylalkoholdehydrogenase-Promotor (US 5,683,439), die Promotoren der vakuolären ATPase Untereinheiten oder der Promotor eines prolinreichen Proteins aus Weizen (WO 91113991), der Pnit-Promoter (Y07648.L, Hillebrand et al. (1998), Plant. Mol. Biol. 36, 89-99, Hillebrand et al. (1996), Gene, 170, 197-200) sowie weitere Promotoren von Genen, deren konstitutive Expression in Pflanzen dem Fachmann bekannt ist.

[0192] Die Expressionskassetten können auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten (Übersichtsartikel: Gatz et al. (1997) Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 48:89-108), durch den die Expression des Ketolase-Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren, wie z.B. der PRP1 Promotor (Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), durch Salicylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzolsulfonamid-induzierbarer Promotor (EP 0 388 186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer Promotor (Gatz et al. (1992) Plant J 2:397-404), ein durch Abscisinsäure induzierbarer Promotor (EP 0 335 528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer Promotor (WO 93121334) können ebenfalls verwendet werden.

[0193] Ferner sind Promotoren bevorzugt, die durch biotischen oder abiotischen Stress induziert werden wie beispielsweise der pathogen-induzierbare Promotor des PRP1-Gens (Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), der hitzeinduzierbare hsp70- oder hsp80-Promoter aus Tomate (US 5,187,267), der kälteinduzierbare alpha-Amylase Promoter aus der Kartoffel (WO 96112814), der licht-induzierbare PPK Promotor oder der verwundungsinduzierte pinII-Promoter (EP375091).

[0194] Pathogen-induzierbare Promotoren umfassen die von Genen, die infolge eines Pathogenbefalls induziert werden wie beispielsweise Gene von PR-Proteinen, SAR-Proteinen, b-1,3-Glucanase, Chitinase usw. (beispielsweise Redolfi et al. (1983) Neth J Plant Pathol 89:245-254; Uknes, et al. (1992) The Plant Cell 4:645-656; Van Loon (1985) Plant Mol Biol 4:111-116; Marneau et al. (1987) Plant Mol Biol 9:335-342; Matton et al. (1987) Molecular Plant-Microbe Interactions 2:325-342; Somssich et al. (1986) Proc Natl Acad Sci USA 83:2427-2430; Somssich et al. (1988) Mol Gen Genetics 2:93-98; Chen et al. (1996) Plant J 10:955-966; Zhang and Sing (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91:2507-2511; Warner, et al. (1993) Plant J 3:191-201; Siebertz et al. (1989) Plant Cell 1:961-968(1989).

[0195] Umfasst sind auch verwundungs-induzierbare Promotoren wie der des pinII Gens (Ryan (1990) Ann Rev Phytopath 28:425-449; Duan et al. (1996) Nat Biotech 14:494-498), des wun1 und wun2-Gens (US 5,428,148), des win1- und win2-Gens (Stanford et al. (1989) Mol Gen Genet 215:200-208), des Systemin (McGurl et al. (1992) Science 225:1570-1573), des WIP1-Gens (Rohmeier et al. (1993) Plant Mol Biol 22:783-792; Ekelkamp et al. (1993) FEBS Letters 323:73-76), des MPI-Gens (Corderok et al. (1994) The Plant J 6(2):141-150) und dergleichen.

[0196] Weitere geeignete Promotoren sind beispielsweise fruchtreifung-spezifische Promotoren, wie beispielsweise der fruchtreifung-spezifische Promotor aus Tomate (WO 94/21794, EP 409 625). Entwicklungsabhängige Promotoren schließt zum Teil die gewebespezifischen Promotoren ein, da die Ausbildung einzelner Gewebe naturgemäß entwicklungsabhängig erfolgt.

[0197] Weiterhin sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, die die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen beispielsweise die Biosynthese von Ketocarotinoiden bzw. dessen Vorstufen stattfindet. Bevorzugt sind beispielsweise Promotoren mit Spezifitäten für die Antheren, Ovarien, Petalen, Sepalen, Blüten, Blätter, Stengel und Wurzeln und Kombinationen hieraus.

[0198] Knollen-, Speicherwurzel- oder Wurzel-spezifische Promotoren sind beispielsweise der Patatin Pro-

motor Klasse I (B33) oder der Promotor des Cathepsin D Inhibitors aus Kartoffel.

[0199] Blattspezifische Promotoren sind beispielsweise der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel (WO 97105900), der SSU Promotor (small subunit) der Rubisco (Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase) oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al. (1989) EM-BO J 8:2445-2451).

[0200] Blütenspezifische Promotoren sind beispielsweise der Phytoen Synthase Promotor (WO 92116635) oder der Promotor des P-rr Gens (WO 98122593) oder der AP3 Promoter aus Arabidopsis thaliana (siehe Beispiel 1).

[0201] Antheren-spezifische Promotoren sind beispielsweise der 5126-Promotor (US 5,689,049, US 5,689,051), den glob-I Promotor oder der g-Zein Promotor.

[0202] Weitere zur Expression in Pflanzen geeignete Promotoren sind beschrieben in Rogers et al. (1987) Meth in Enzymol 153:253-277; Schardl et al. (1987) Gene 61:1-11 und Berger et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:8402-8406).

[0203] Alle in der vorliegenden Anmeldung beschriebenen Promotoren ermöglichen in der Regel die Expression der Ketolase in Blütenblättern der erfindungsgemäßen Pflanzen.

[0204] Besonders bevorzugt im erfindungsgemäßen Verfahren sind konstitutive, blütenspezifische und insbesondere blütenblattspezifische Promotoren.

[0205] Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt vorzugsweise durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer vorstehend beschriebenen Nukleinsäure kodierend eine Ketolase und vorzugsweise einer zwischen Promotor und Nukleinsäure-Sequenz inserierten Nukleinsäure, die für ein plastidenspezifisches Transitpeptid kodiert, sowie einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) beschrieben sind.

[0206] Die vorzugsweise insertierte Nukleinsäuren kodierend ein plastidäres Transitpeptid, gewährleisten die Lokalisation in Plastiden und insbesondere in Chromoplasten.

[0207] Es können auch Expressionskassetten verwendet werden, deren Nukleinsäure-Sequenz für ein Ketolase-Fusionsprotein kodiert, wobei ein Teil des Fusionsproteins ein Transitpeptid ist, das die Translokation des Polypeptides steuert. Bevorzugt sind für die Chromoplasten spezifische Transitpeptide, welche nach Translokation der Ketolase in die Chromoplasten vom Ketolase-Teil enzymatisch abgespalten werden.

[0208] Insbesondere bevorzugt ist das Transitpeptid, das von der plastidären Nicotiana tabacum Transketolase oder einem anderen Transitpeptid (z.B. dem Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Rubisco (rbcS) oder der Ferredoxin NADP Oxidoreduktase als auch der Isopentenylpyrophosphat Isomerase-2) oder dessen funktionellem Äquivalent abgeleitet ist.

[0209] Besonders bevorzugt sind Nukleinsäure-Sequenzen von drei Kassetten des Plastiden-Transitpeptids der plastidären Transketolase aus Tabak in drei Leserastern als KpnI/BamHI Fragmente mit einem ATG-Codon in der NcoI Schnittstelle:

#### pTP09

KpnI\_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTG  
TCCCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCCTTCTTCTCT-  
CACTTTTTCCGGCCTTAAATCCAATCCCAATATCACCACTCCCGCCGCCG-  
TACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCTCGTAAGGTCACCGGCGATTTCGTGCCT-  
CAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAAGTCTGAGACTGCGGGATCC\_BamHI

#### pTP10

KpnI\_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTG  
TCCCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCCTTCTTCTCT-  
CACTTTTTCCGGCCTTAAATCCAATCCCAATATCACCACTCCCGCCGCCG-  
TACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCTCGTAAGGTCACCGGCGATTTCGTGCCT-  
CAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAAGTCTGAGACTGCGCTGGATCC\_BamHI

KpnI\_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTG  
 TCCCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCTTCTTCTCT-  
 CACTTTTTCCGGCCTTAAATCCAATCCCAATATCACCACCTCCCGCCGCCG-  
 TACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCGTCTGTAAGGTCACCGGCGATTTCGTGCCT-  
 CAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAAGTGAAGTGGGGATCC\_BamHI

- [0210] Weitere Beispiele für ein plastidäres Transitpeptid sind das Transitpeptid der plastidären Isopentenyl-pyrophosphat Isomerase-2 (IPP-2) aus *Arabidopsis thaliana* und das Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Ribulosebisphosphat Carboxylase (rbcS) aus Erbse (Guerineau, F, Woolston, S, Brooks, L, Mullineaux, P (1988) An expression cassette for targeting foreign proteins into the chloroplasts. Nucl. Acids Res. 16: 11380).
- [0211] Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen Nukleinsäure-Bestandteilen enthalten, sowie aus verschiedenen heterologen Genabschnitten verschiedener Organismen bestehen.
- [0212] Bevorzugt sind, wie vorstehend beschrieben, synthetische Nukleotid-Sequenzen mit Kodons, die von Pflanzen der Gattung *Tagetes* bevorzugt werden. Diese von Pflanzen bevorzugten Kodons können aus Kodons mit der höchsten Proteinhäufigkeit bestimmt werden, die in den meisten interessanten Pflanzenspezies exprimiert werden.
- [0213] Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente manipuliert werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Richtung liest und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist. Für die Verbindung der DNA-Fragmente miteinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker angesetzt werden.
- [0214] Zweckmäßigerweise können die Promotor- und die Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Polylinker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat der Linker 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog zur Wirtspflanze sein. Die Expressionskassette beinhaltet vorzugsweise in der 5'-3'-Transkriptionsrichtung den Promotor, eine kodierende Nukleinsäuresequenz oder ein Nukleinsäurekonstrukt und eine Region für die transkriptionale Termination. Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig austauschbar.
- [0215] Beispiele für einen Terminator sind der 35S-Terminator (Guerineau et al. (1988) Nucl Acids Res. 16: 11380), der nos Terminator (Depicker A, Stachel S, Dhaese P, Zambryski P, Goodman HM. Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. J Mol Appl Genet. 1982;1(6):561-73) oder der ocs Terminator (Gielen, J, de Beuckeleer, M, Seurinck, J, Debroek, N, de Greve, N, Lemmers, M, van Montagu, M, Schell, J (1984) The complete sequence of the TL-DNA of the *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTiAch5. EMBO J. 3: 835-846).
- [0216] Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen und Transversionen in Frage kommen, können in vitro-Mutagenese, "primer-repair", Restriktion oder Ligation verwendet werden.
- [0217] Bei geeigneten Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewing-back" oder Auffüllen von Überhängen für "bluntends", können komplementäre Enden der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden.
- [0218] Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA-Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens*, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids pTiACH5 entsprechen (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984), 835 ff) oder funktionelle Äquivalente.
- [0219] Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet.
- [0220] Dazu können an sich bekannte Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengewebe oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt werden.
- [0221] Geeignete Methoden zur Transformation von Pflanzen sind die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone – die sogenannte particle bombardment Methode, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der, vorstehend beschriebene, durch *Agrobacterium* vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128-143 sowie in Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205-225 beschrieben.
- [0222] Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, *Agrobacterium tumefaciens* zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984), 8711)

oder besonders bevorzugt pSUN2, pSUN3, pSUN4 oder pSUN5 (WO 02/00900).

[0223] Mit einem Expressionsplasmid transformierte Agrobakterien können in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

[0224] Zur bevorzugten Herstellung von genetisch veränderten Pflanzen, im folgenden auch transgene Pflanzen bezeichnet, wird die fusionierte Expressionskassette, die eine Ketolase exprimiert, in einen Vektor, beispielsweise pBin19 oder insbesondere pSUN2 kloniert, der geeignet ist, in *Agrobacterium tumefaciens* transformiert zu werden. Mit einem solchen Vektor transformierte Agrobakterien können dann in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen verwendet werden, indem beispielsweise verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

[0225] Die Transformation von Pflanzen durch Agrobakterien ist unter anderem bekannt aus F.F. White, *Vectors for Gene Transfer in Higher Plants*; in *Transgenic Plants*, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15-38. Aus den transformierten Zellen der verwundeten Blätter bzw. Blattstücke können in bekannter Weise transgene Pflanzen regeneriert werden, die ein in die Expressionskassette integriertes Gen für die Expression einer Nukleinsäure codierend eine Ketolase enthalten.

[0226] Zur Transformation einer Wirtspflanze der Gattung *Tagetes* mit einer für eine Ketolase kodierenden Nukleinsäure wird eine Expressionskassette als Insertion in einen rekombinanten Vektor eingebaut, dessen Vektor-DNA zusätzliche funktionelle Regulationssignale, beispielsweise Sequenzen für Replikation oder Integration enthält. Geeignete Vektoren sind unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S. 71-119 (1993) beschrieben.

[0227] Unter Verwendung der oben zitierten Rekombinations- und Klonierungstechniken können die Expressionskassetten in geeignete Vektoren kloniert werden, die ihre Vermehrung, beispielsweise in *E. coli*, ermöglichen. Geeignete Klonierungsvektoren sind u.a. pJ1T117 (Guerineau et al. (1988) *Nucl. Acids Res.* 16 :11380), pBR332, pUC-Serien, M13mp-Serien und pACYC184. Besonders geeignet sind binäre Vektoren, die sowohl in *E. coli* als auch in Agrobakterien replizieren können.

[0228] Dabei kann je nach Wahl des Promotors die Expression konstitutiv oder vorzugsweise spezifisch in den Blütenblättern erfolgen.

[0229] Die erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen der Gattung *Tagetes* weisen im Vergleich zum Wildtyp einen Gehalt an Astaxanthin, insbesondere in Petalen auf.

[0230] Wie vorstehend erwähnt, betrifft die Erfindung die Verwendung astaxanthinhaltiger Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung *Tagetes* oder astaxanthinhaltiger Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung *Tagetes* zur oralen Verabreichung an Tiere.

[0231] In einer bevorzugten Ausführungsform werden die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung *Tagetes* oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung *Tagetes* zur Pigmentierung von Tieren und der entsprechenden Tierprodukte verwendet.

[0232] Unter astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen werden bevorzugt Lösungen, enthaltend Astaxanthin verstanden, die durch Extraktion aus astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen mit mindestens einem geeigneten Lösungsmittel hergestellt wurden. Je nach verwendetem Lösungsmittel und verwendeten weiteren chemischen und physikalischen Reinigungsverfahren kann das Astaxanthin in beliebigen Reinheitsgraden im Extrakt vorliegen. Es ist vorteilhaft, die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile vor Extraktion entsprechend aufzubereiten, beispielsweise die Pflanzen oder Pflanzenteile zu trocknen und zu zerkleinern, wobei die Reihenfolge beliebig ist.

[0233] Astaxanthin kann aus den astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen, die gegebenenfalls vorher getrocknet und/oder zerkleinert wurden durch organische Lösungsmittel extrahiert werden, wie beispielsweise durch Aceton, Hexan, Methylenchlorid, Methyl-tertiär-Butyl-ether oder durch Lösungsmittelgemische wie Ethanol/Hexan oder Aceton/Hexan. Durch unterschiedliche Mischungsverhältnisse der Lösungsmittel kann aufgrund der verschiedenen Polarität die Extraktionswirkung variiert werden. Durch eine solche Extraktion lässt sich Astaxanthin mit hoher Konzentration anreichern.

[0234] Anschließend kann durch Ausschütteln von Astaxanthin und chromatografische Auftrennung des Gemisches die Reinheit von Astaxanthin weiter erhöht werden. Astaxanthin liegt in der Regel als Gemisch aus Mono- und Diestern vor, meist als Ester der Palmitinsäure.

[0235] Unter „Pigmentierung“ wird erfindungsgemäß vorzugsweise die Intensivierung oder Verursachung einer Farbe zumindest eines Teils eines Tieres oder Tierproduktes des pigmentierten Tieres im Vergleich zum nicht pigmentierten Tier verstanden. Astaxanthinhaltige Pigmentierstoffe pigmentieren und verursachen oder intensivieren in der Regel einen rosa bis rosa-roten Farbton.

[0236] Bevorzugte Tiere die durch die erfindungsgemäße orale Verabreichung pigmentiert werden können sind Tiere, ausgewählt aus der Gruppe Fische, Crustaceae oder Vögel, insbesondere Galliformes und Anatridae.

- [0237] Bevorzugte Fische sind Salmoniden, insbesondere Lachs oder Forelle.
- [0238] Bevorzugte Crustaceae sind Shrimps oder Krebse.
- [0239] Bevorzugte Galliformes sind Hühner, Enten oder Gänse.
- [0240] Bevorzugter Anatridae ist Flamingo.
- [0241] Je nach pigmentiertem Tier werden vorzugsweise unter pigmentierten Tierprodukten insbesondere Fleisch für Lachs oder Forelle, Haut für Hühner, Enten oder Gänse, Feder für Hühner, Enten, Gänse oder Flamingo und Ei bzw. Eidotter für Hühner, Enten oder Gänse verstanden.
- [0242] Die orale Verabreichung der astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes an Tiere kann direkt erfolgen oder über orale Verabreichung von Tierfutterzubereitungen, denen zuvor die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes beigemischt wurden.
- [0243] In einer bevorzugten Ausführungsform werden die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes Tierfutterzubereitungen beigemischt und die Tierfutterzubereitung an Tiere oral verabreicht.
- [0244] Dabei ist es vorteilhaft, die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes vor der Beimischung zu Tierfutterzubereitungen in eine Form zu prozessieren, die eine Beimischung zu entsprechenden Tierfutterzubereitung ermöglicht und vorzugsweise zu einer hohen Stabilität und Biovertügbarekeit von Astaxanthin im jeweiligen Anwendungsbereich führt.
- [0245] Je nach Tier, an das die orale Verabreichung erfolgen soll und damit je nach Tierfutterzubereitung können dazu verschiedene Prozessierungsschritte vorteilhaft sein.
- [0246] Für astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes, ist es in dieser Ausführungsform vorteilhaft, die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile, insbesondere Blütenköpfe und Petalen zu trocknen und/oder zu zerkleinern. Besonders bevorzugt liegen die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes in Pulverform vor.
- [0247] Jede wie auch immer gestaltete Ausführungsform der astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes, ob prozessiert oder nicht prozessiert, kann in an sich bekannter Weise Tierfutterzubereitungen beigemischt werden.
- [0248] Für astaxanthinhaltigen Extrakte astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes, sind in dieser Ausführungsform verschiedene Prozessierungsschritte vorteilhaft.
- [0249] Die astaxanthinhaltigen Extrakte können, soweit die noch enthaltenen Lösungsmittel für die entsprechenden Tiere physiologisch unbedenklich sind, direkt der Tierfutterzubereitung beigemischt werden.
- [0250] Die Extrakte können nach Abdampfen der noch enthaltenen Lösungsmittel in Form von astaxanthinhaltigen Pulver oder Ölen eingesetzt werden.
- [0251] Die erhaltenen astaxanthinhaltigen Pulver oder Öle können beispielsweise in Fischöl eingearbeitet werden, auf pulverige Trägermaterialien, wie beispielsweise Weizenmehl oder geriebene Tagetespetalen, aufgebracht werden, oder in Alginate, Gelatine oder Lipide eingeschlossen werden.
- [0252] Die astaxanthinhaltigen Extrakte oder prozessierten Extrakte liegen somit bevorzugt in flüssiger oder pulverisierter Form vor.
- [0253] Jede wie auch immer gestaltete Ausführungsform der astaxanthinhaltigen Extrakte astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes, ob prozessiert oder nicht prozessiert, kann in an sich bekannter Weise Tierfutterzubereitungen beigemischt werden.
- [0254] Der Erfindung betrifft daher auch Tierfutterzubereitungen, enthaltend astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes.
- [0255] Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung von Tierfutterzubereitungen durch Zusammenfügen von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes und üblichen Tierfuttermitteln.
- [0256] Eine bevorzugte Ausführungsform des Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes vor dem Zusammenfügen mit Tierfuttermitteln in eine Form prozessiert werden, die ein Zusammenfügen mit Tierfuttermitteln ermöglicht.
- [0257] Beispielsweise für Fische können die Fischfutterzubereitungen weitere übliche Fischfutterkomponenten enthalten, wie beispielsweise Fischmehl und/oder andere Proteine, Öle, wie beispielsweise Fischöle, Getreide, Vitamine, Mineralien, Konservierungsstoffe und gegebenenfalls Medikamente in üblichen Mengen.
- [0258] Eine typische Fischfutterrezeptur für Forellen setzt sich beispielsweise aus folgenden Komponenten zusammen:



<b>Komponenten</b>	<b>Einwaage f. 500 kg</b>	
	<b>Gew.-%</b>	<b>kg</b>
Fischmehl	30,00	150,00
Sojavollfettbohnen	20,00	100,00
Weizenquellstärke	18,00	90,00
Vitamin-Prämix	0,80	4,00
Cholinchlorid (50%)	0,20	1,00
Weizenkleber	20,00	100,00
Sipernat 50S	3,00	15,00
Fischöl	8,00	40,00

[0259] Eine typische Fischfutterrezeptur für Lachse setzt sich beispielsweise aus folgenden Komponenten zusammen:

<b>Komponenten</b>	<b>Gew.-%</b>
Fischmehl	75,00
Pflanzliches Protein	5,00
Getreide	7,80
Vitamine/Mineralien	1,00
Antioxidantien/Konservierungsstoffe	0,20
Fischöl	11,00

[0260] In einer Ausführungsform werden die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte den Tierfutterzubereitungen vorzugsweise in getrockneter und zerkleinerter Pulverform beigemischt.

[0261] Die so erhaltenen Tierfutterzubereitungen, enthaltend astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltige Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes, können bei Fischfutter beispielsweise in an sich bekannter Weise pelletiert oder besonders vorteilhaft extrudiert werden.

[0262] In einer bevorzugten Ausführungsform werden die astaxanthinhaltigen Extrakte den Tierfutterzubereitungen vorzugsweise in flüssiger Form beigemischt. Dies ist insbesondere vorteilhaft bei der Herstellung von extrudierten Fischfutterzubereitungen. Der Extrusionsprozess führt zu Extrusionsstress auf die empfindliche Stoffe, wie beispielsweise Astaxanthin, der zu einem Astaxanthinverlust führen kann. Bei Extrusionsstress handelt es sich primär um die Einwirkung mechanische Kräfte (Kneten, Scherung, Druck, etc.) jedoch auch um hydrothermischen Stress, verursacht durch Wasser- und Wasserdampfzugaben, auch oxidativer Stress ist zu beobachten.

[0263] Um die durch den oben beschriebenen Extrusionsprozess auftretenden Astaxanthinverluste zu vermeiden, können flüssige astaxanthinhaltige Extrakte durch die sogenannte PPA-Technik nach dem Extrusions- und Trocknungsprozess unter Vakuum appliziert werden (post pelleting application).

[0264] In einer weiteren, bevorzugten Ausführungsform werden die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes direkt an Tiere oral verabreicht.

[0265] Dabei ist es vorteilhaft, die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder



die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes vor der Verabreichung in eine Form zu prozessieren, die eine direkte orale Verabreichung an Tiere ermöglicht und vorzugsweise zu einer hohen Stabilität und Bioverfügbarkeit von Astaxanthin im jeweiligen Anwendungsbe- reich führt.

[0266] Je nach Tier, an das die orale Verabreichung erfolgen soll und damit je nach Tierfutterzubereitung kön- nen dazu verschiedene Prozessierungsschritte vorteilhaft sein.

[0267] Für astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes, ist es in dieser Ausführungs- form vorteilhaft, die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile, insbesondere Blütenköpfe und Petalen zu trocknen und/oder zu zerkleinern. Besonders bevorzugt liegen die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes in Pulverform vor.

[0268] Jede wie auch immer gestaltete Ausführungsform der astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes, ob prozessiert oder nicht prozessiert, kann in an sich bekannter Weise oral an Tiere ver- abreicht werden.

[0269] Für astaxanthinhaltigen Extrakte astaxanthinhaltiger Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes, sind in dieser Ausführungsform verschiedene Prozessierungsschritte vorteilhaft.

[0270] Die astaxanthinhaltigen Extrakte können, soweit die noch enthaltenen Lösungsmittel für die entspre- chenden Tiere physiologisch unbedenklich sind, direkt oral an Tiere verabreicht werden.

[0271] Die Extrakte können nach Abdampfen der noch enthaltenen Lösungsmittel in Form von astaxanthin- haltigen Pulver oder Ölen verabreicht werden.

[0272] Die erhaltenen astaxanthinhaltigen Pulver oder Öle können beispielsweise in Fischöl eingearbeitet werden, auf pulverige Trägermaterialien, wie beispielsweise Weizenmehl oder geriebene Tagetespetalen, auf- gebracht werden, oder in Alginate, Gelatine oder Lipide eingeschlossen werden.

[0273] Die astaxanthinhaltigen Extrakte oder prozessierten Extrakte liegen somit bevorzugt in flüssiger oder pulverisierter Form vor.

[0274] Jede wie auch immer gestaltete Ausführungsform der astaxanthinhaltigen Extrakte astaxanthinhaltiger Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes, ob prozessiert oder nicht prozessiert, kann in an sich be- kannter Weise oral an Tiere verabreicht werden.

[0275] Der Erfindung betrifft daher auch Pigmentiermittel, enthaltend astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes, wobei die astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes gegebenenfalls wie vorstehend beschrieben prozessiert sein können.

[0276] In einer bevorzugten Ausführungsform bestehen die Pigmentiermittel aus astaxanthinhaltigen Pflan- zen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder aus astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes, wobei die astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzentei- len der Gattung Tagetes gegebenenfalls wie vorstehend beschrieben prozessiert sein können.

[0277] Bei besonders bevorzugten Pigmentiermitteln verwendet man als Pflanzenteile Blütenköpfe oder Pe- talen.

[0278] Die Erfindung betrifft ferner eine Verfahren zur Pigmentierung von Tieren oder Tierprodukten durch orale Verabreichung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxan- thinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes an Tiere.

[0279] Ferner betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von pigmentierten Tieren oder Tierprodukten durch oralen Verabreichung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes an Tiere.

[0280] Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes als Tierfutter oder Tierfutterzusatz.

[0281] Die Pigmentiermittel, enthaltend astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltige Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes bzw. Tierfuttermittel enthaltend diese Pigmentiermittel weisen weiterhin den Vorteil einer hohen Lagerstabilität und Bioverfügbarkeit des Pigments Astaxanthin auf.

[0282] Die Erfindung wird durch die nun folgenden Beispiele erläutert, ist aber nicht auf diese beschränkt:

#### Beispiel I

#### Herstellung astaxanthinhaltiger, genetisch veränderter Pflanzen der Gattung Tagetes

[0283] Allgemeine Experimentelle Bedingungen:

## Sequenzanalyse rekombinanter DNA

[0284] Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma Licor (Vertrieb durch MWG Biotech, Ebersbach) nach der Methode von Sanger (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463-5467).

## Beispiel I.1:

[0285] Amplifikation einer cDNA, die die gesamte Primärsequenz der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* Flotow em. Wille codiert

[0286] Die cDNA, die für die Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* codiert, wurde mittels PCR aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80 der "Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen") Suspensionskultur amplifiziert.

[0287] Für die Präparation von Total-RNA aus einer Suspensionskultur von *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80), die 2 Wochen mit indirektem Tageslicht bei Raumtemperatur in *Haematococcus*-Medium (1.2 g/l Natriumacetat, 2 g/l Hefeextrakt, 0.2 g/l  $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.02  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ; pH 6.8; nach Autoklavieren Zugabe von 400 mg/l L-Asparagin, 10 mg/l  $\text{FeSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ ) gewachsen war, wurden die Zellen geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Mörser pulverisiert. Anschließend wurden 100 mg der gefrorenen, pulverisierten Algenzellen in ein Reaktionsgefäß überführt und in 0.8 ml Trizol-Puffer (Life Technologies) aufgenommen. Die Suspension wurde mit 0.2 ml Chloroform extrahiert. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 12 000 g wurde der wässrige Überstand abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumen Ethanol extrahiert. Die RNA wurde mit einem Volumen Isopropanol gefällt, mit 75% Ethanol gewaschen und das Pellet in DEPC Wasser (über Nacht Inkubation von Wasser mit 1/1000 Volumen Diethylpyrocarbonat bei Raumtemperatur, anschließend autoklaviert) gelöst. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt.

[0288] Für die cDNA-Synthese wurden 2.5 ug Gesamt-RNA für 10 min bei 60°C denaturiert, für 2 min auf Eis abgekühlt und mittels eines cDNA-Kits (Ready-to-go-you-prime-beads, Pharmacia Biotech) nach Herstellerangaben unter Verwendung eines antisense spezifischen Primers (PR1 SEQ ID NO: 29) in cDNA umgeschrieben.

[0289] Die Nukleinsäure codierend eine Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80) wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Haematococcus pluvialis* unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR2 SEQ ID NO: 30) und eines antisense spezifischen Primers (PR1 SEQ ID NO: 29) amplifiziert.

[0290] Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der cDNA, die für ein Ketolase Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz codiert, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 4 ml einer *Haematococcus pluvialis* cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR1 (SEQ ID NO: 29)
- 0.2 mM PR2 (SEQ ID NO: 30)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 25.8 ml Aq. Dest.

[0291] Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94_C	2 Minuten
35X	94_C	1 Minute
	53_C	2 Minuten
	72_C	3 Minuten
1X	72_C	10 Minuten

[0292] Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID NO: 29 und SEQ ID NO: 30 resultierte in einem 1155 Bp-Fragment, das für ein Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz codiert (SEQ ID NO: 22). Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Amplifikat in den PCR-Klonierungsvektor pGEM-Teasy (Promega) kloniert und der Klon pGKETO2 erhalten.

[0293] Sequenzierung des Klons pGKETO2 mit dem T7- und dem SP6-Primer bestätigte eine Sequenz, die sich lediglich in den drei Codons 73, 114 und 119 in je einer Base von der publizierten Sequenz X86782 unterscheidet. Diese Nukleotidaustausche wurden in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentieren somit die Nukleotidsequenz im verwendeten *Haematococcus pluvialis* Stamm 192.80 (Abb. 1 und 2, Sequenzvergleiche).

[0294] Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet. Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1027 Bp SpHI-Fragmentes aus pGEM-Teasy und Ligierung in den SpHI geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der die Haematococcus pluvialis Ketolase in der korrekten Orientierung als N-terminale translationale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heißt pJKETO2.

#### Beispiel I.2:

[0295] Amplifikation einer cDNA, die die Ketolase aus Haematococcus pluvialis Flotow em. Wille mit einem um 14 Aminosäuren verkürztem N-terminus codiert

[0296] Die cDNA, die für die Ketolase aus Haematococcus pluvialis (Stamm 192.80) mit einem um 14 Aminosäuren verkürztem N-Terminus codiert, wurde mittels PCR aus Haematococcus pluvialis Suspensionskultur (Stamm 192.80 der "Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen") amplifiziert.

[0297] Die Präparation von Total-RNA aus einer Suspensionskultur von Haematococcus pluvialis (Stamm 192.80) erfolgte wie in Beispiel 1 beschrieben.

[0298] Die cDNA-Synthese erfolgte wie unter Beispiel 1 beschrieben.

[0299] Die Nukleinsäure kodierend eine Ketolase aus Haematococcus pluvialis (Stamm 192.80) mit einem um 14 Aminosäuren verkürztem N-Terminus wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus Haematococcus pluvialis unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR3 SEQ ID NO: 31) und eines antisense spezifischen Primers (PR1 SEQ ID NO: 29) amplifiziert.

[0300] Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der cDNA, die für ein Ketolase Protein mit um 14 Aminosäuren verkürztem N-Terminus codiert, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 4 ml einer Haematococcus pluvialis cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR1 (SEQ ID NO: 29)
- 0.2 mM PR3 (SEQ ID NO: 31)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 25.8 ml Aq. Dest.

[0301] Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94_C	2 Minuten
35X	94_C	1 Minute
	53_C	2 Minuten
	72_C	3 Minuten
1X	72_C	10 Minuten

[0302] Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID NO: 29 und SEQ ID NO: 31 resultierte in einem 1111 Bp Fragment, das für ein Ketolase Protein codiert, bei dem N-terminalen Aminosäuren (Position 2-16) durch eine einzige Aminosäure (Leucin) ersetzt sind.

[0303] Das Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pGEM-Teasy (Promega) kloniert. Sequenzierungen mit den Primern T7- und SP6 bestätigten eine zur Sequenz SEQ ID NO: 22 identische Sequenz, wobei die 5'Region (Position 1-53) der SEQ ID NO: 22 im Amplifikat SEQ ID NO: 24 durch eine in der Sequenz abweichende Nonamersequenz ersetzt wurde. Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

[0304] Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 985 Bp SpHI Fragmentes aus pGEM-Teasy und Ligierung mit dem SpHI geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der die Haematococcus pluvialis Ketolase mit einem um 14 Aminosäuren verkürztem N-Terminus in der korrekten Orientierung als N-terminale translationale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJKETO3.

#### Beispiel I.3:

[0305] Amplifikation einer cDNA, die die Ketolase aus Haematococcus pluvialis Flotow em. Wille (Stamm 192.80 der "Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen") bestehend aus der gesamten Primärsequenz und fusioniertem C-terminalem myc-Tag codiert.

[0306] Die cDNA, die für die Ketolase aus Haematococcus pluvialis (Stamm 192.80) bestehend aus der ge-

samten Primärsequenz und fusioniertem C-terminalem myc-Tag codiert, wurde mittels PCR unter Verwendung des Plasmids pGKETO2 (in Beispiel 1 beschrieben) und des Primers PR15 (SEQ ID NO: 32) hergestellt. Der Primer PR15 setzt sich zusammen aus einer antisense spezifischen 3'Region (Nucleotide 40 bis 59) und einer myc-Tag codierenden 5'Region (Nucleotide 1 bis 39).

[0307] Die Denaturierung (5 min bei 95\_C) und Annealing (langsame Abkühlung bei Raumtemperatur auf 40\_C) von pGKETO2 und PR15 erfolgte in einem 11.5 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 mg pGKETO2 PlasmidDNA
- 0.1 mg PR15 (SEQ ID NO: 32)

[0308] Das Auffüllen der 3'Enden (30 min bei 30\_C) erfolgte in einem 20 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 11.5 ml pGKETO2/PR15-Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 50 mM dNTPs
- 2 ml 1X Klenow Puffer
- 2U Klenow Enzym

[0309] Die Nukleinsäure kodierend eine Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80) bestehend aus der gesamten Primärsequenz und fusioniertem C-terminalem myc-Tag wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Haematococcus pluvialis* unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR2 SEQ ID NO: 30) und eines antisense spezifischen Primers (PR15 SEQ ID NO: 32) amplifiziert.

[0310] Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der cDNA, die für ein Ketolase Protein mit fusioniertem C-terminalem myc-Tag codiert, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 ml einer Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR15 (SEQ ID NO: 32)
- 0.2 mM PR2 (SEQ ID NO: 30)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 ml Aq. Dest.

[0311] Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94_C	2 Minuten
35X	94_C	1 Minute
	53_C	1 Minute
	72_C	1 Minute
1X	72_C	10 Minuten

[0312] Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID NO:32 und SEQ ID NO:30 resultierte in einem 1032 Bp-Fragment, das für ein Protein codiert, bestehend aus der gesamten Primärsequenz der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* als zweifache translationale Fusion mit dem rbcS Transitpeptide am N-Terminus und dem myc-Tag am C-Terminus.

[0313] Das Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pGEM-Teasy (Promega) kloniert. Sequenzierungen mit den Primern T7- und SP6 bestätigten eine zur Sequenz SEQ ID NO: 22 identische Sequenz, wobei die 3'Region (Position 993 bis 1155) der SEQ ID NO: 22 im Amplifikat SEQ ID NO: 26 durch eine in der abweichende Sequenz aus 39 Bp ersetzt wurde. Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

[0314] Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1038 Bp EcoRI-SpHI Fragmentes aus pGEM-Teasy und Ligation mit dem EcoRI-SpHI geschnittenen Vektor pJIT117. Durch die Ligation entsteht eine translationale Fusion zwischen dem C-Terminus der rbcS Transitpeptidsequenz und dem N-Terminus der Ketolase Sequenz. Der Klon, der die *Haematococcus pluvialis* Ketolase mit fusioniertem C-terminalem myc-Tag in der korrekten Orientierung als translationale N-terminale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJKETO4.

#### Beispiel I.4:

[0315] Amplifikation einer DNA, die die gesamte Primärsequenz der Ketolase aus *Nostoc sp.* PCC 7120 codiert

[0316] Die DNA, die für die Ketolase aus Nostoc PCC 7120 kodiert, wurde mittels PCR aus Nostoc PCC 7120 (Stamm der "Pasteur Culture Collection of Cyanobacterium") amplifiziert.

[0317] Für die Präparation von genomischer DNA aus einer Suspensionskultur von Nostoc PCC 7120, die 1 Woche mit Dauerlicht und konstantem Schütteln (150 rpm) at 25°C in BG 11-Medium (1.5 g/l NaNO<sub>3</sub>, 0.04 g/l K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> × 3H<sub>2</sub>O, 0.075 g/l MgSO<sub>4</sub> × H<sub>2</sub>O, 0.036 g/l CaCl<sub>2</sub> × 2H<sub>2</sub>O, 0.006 g/l citric acid, 0.006 g/l Ferric ammonium citrate, 0.001 g/l EDTA disodium magnesium, 0.04 g/l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1ml trace metal mix AS + Co (2.86 g/l H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1.81 g/l MnCl<sub>2</sub> × 4H<sub>2</sub>O, 0.222 g/l ZnSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O, 0.39 g/l NaMoO<sub>4</sub> × 2H<sub>2</sub>O, 0.079 g/l CuSO<sub>4</sub> × 5H<sub>2</sub>O, 0.0494 g/l Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> × 6H<sub>2</sub>O) gewachsen war, wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Mörser pulverisiert.

[0318] Protokoll für DNA Isolation aus Nostoc PCC7120:

Aus einer 10 ml Flüssigkultur wurden die Bakterienzellen durch 10minütige Zentrifugation bei 8 000 rpm pelletiert. Anschließend wurden die Bakterienzellen in flüssigem Stickstoff mit einem Mörser zerstoßen und gemahlen. Das Zellmaterial wurde in 1 ml 10mM Tris HCl (pH 7.5) resuspendiert und in ein Eppendorf Reaktionsgefäß (2ml Volumen) überführt. Nach Zugabe von 100 µl Proteinase K (Konzentration: 20 mg/ml) wurde die Zellsuspension für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension mit 500 µl Phenol extrahiert. Nach 5minütiger Zentrifugation bei 13 000 upm wurde die obere, wässrige Phase in ein neues 2 ml-Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion mit Phenol wurde 3mal wiederholt. Die DNA wurde durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5.2) und 0.6 Volumen Isopropanol gefällt und anschließend mit 70% Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet, in 25 µl Wasser aufgenommen und unter Erhitzung auf 65°C gelöst.

[0319] Die Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase aus Nostoc PCC 7120, wurde mittels "polymerase chain reaction" (PCR) aus Nostoc PCC 7120 unter Verwendung eines sense-spezifischen Primers (NOSTF, SEQ ID No. 87) und eines antisense-spezifischen Primers (NOSTG, SEQ ID NO. 88) amplifiziert.

[0320] Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die für ein Ketolase Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl einer Nostoc PCC 7120 DNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM NOSTF (SEQ ID No. 87)
- 0.2 mM NOSTG (SEQ ID No. 88)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 25.8 µl Aq. Dest.

[0321] Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94°C	2 Minuten
35X	94°C	1 Minute
	55°C	1 Minuten
	72°C	3 Minuten
1X	72°C	10 Minuten

[0322] Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID No. 87 und SEQ ID No. 88 resultierte in einem 805 Bp-Fragment, das für ein Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert (SEQ ID No. 89). Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Amplifikat in den PCR-Klonierungsvektor pGEM-T (Promega) kloniert und der Klon pNOSTF-G erhalten.

[0323] Sequenzierung des Klons pNOSTF-G mit dem M13F- und dem M13R-Primer bestätigte eine Sequenz, welche mit der DNA-Sequenz des Datenbankeintrages AP003592 identisch ist. Diese Nukleotidsequenz wurde in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentiert somit die Nukleotidsequenz im verwendeten Nostoc PCC 7120.

[0324] Dieser Klon pNOSTF-G wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet. Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1027 Bp SphI-Fragmentes aus pGEM-T und Ligierung in den SphI geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der die Ketolase von Nostoc in der korrekten Orientierung als N-terminale translationale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJNOST.

## Beispiel I.5:

Herstellung von Expressionsvektoren zur konstitutiven Expression der *Haematococcus pluvialis* Ketolase in *Tagetes erecta*.

[0325] Die Expression der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* in *Tagetes erecta* erfolgte unter Kontrolle des konstitutiven Promoters d35S aus CaMV (Franck et al. 1980, Cell 21: 285-294). Die Expression erfolgte mit dem Transitpeptid rbcS aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715).

[0326] Die Herstellung einer Expressionskassette für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (W002/00900).

[0327] Zur Herstellung des *Tagetes*-Expressionsvektors pS5KETO2 wurde das 2.8 Kb SacI-XhoI Fragment aus pJKETO2 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (**Abb. 3**, Konstruktkarte). In der **Abb. 3** beinhaltet Fragment d35S den duplizierten 35S Promoter (747 bp), Fragment rbcS das rbcS Transitpeptid aus Erbse (204 bp), Fragment KETO2 (1027 bp) die gesamte Primärsequenz codierend für die *Haematococcus pluvialis* Ketolase, Fragment term (761 bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

## Beispiel I.5A:

Herstellung von Expressionsvektoren zur blütenspezifischen Expression der *Haematococcus pluvialis* Ketolase in *Tagetes erecta*.

[0328] Die Expression der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* in *Tagetes erecta* erfolgte mit dem Transitpeptid rbcS aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715). Die Expression erfolgte unter Kontrolle einer modifizierten Version AP3P des blütenspezifischen Promoters AP3 aus *Arabidopsis thaliana* (AL132971: Nukleotidregion 9298 bis 10200; Hill et al. (1998) Development 125: 1711-1721).

[0329] Das DNA Fragment, das die AP3 Promoterregion -902 bis +15 aus *Arabidopsis thaliana* beinhaltet, wurde mittels PCR unter Verwendung genomischer DNA (nach Standardmethoden aus *Arabidopsis thaliana* isoliert) sowie der Primer PR7 (SEQ ID NO: 33) und PR10 (SEQ ID NO: 36) hergestellt.

[0330] Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die das AP3-Promoterfragment (-902 bis +15) beinhaltet, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 100 ng genomischer DNA aus *A.thaliana*
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR7 (SEQ ID NO: 33)
- 0.2 mM PR10 (SEQ ID NO: 36)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 ml Pfu Polymerase (Stratagene)
- 28.8 ml Aq. Dest.

[0331] Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94_C	2 Minuten
35X	94_C	1 Minute
	50_C	1 Minute
	72_C	1 Minute
1X	72_C	10 Minuten

[0332] Das 922 Bp Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pTAP3 erhalten.

[0333] Sequenzierung des Klons pTAP3 bestätigte eine Sequenz, die sich lediglich in durch eine Insertion (ein G in Position 9765 der Sequenz AL132971) und einen Basenaustausch (ein G statt ein A in Position 9726 der Sequenz AL132971) von der publizierten AP3 Sequenz (AL132971, Nukleotidregion 9298 bis 10200) unterscheidet. Diese Nukleotidunterschiede wurden in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentieren somit die tatsächliche Nukleotidsequenz in den verwendeten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen.

[0334] Die modifizierte Version AP3P wurde mittels rekombinanter PCR unter Verwendung des Plasmids pTAP3 hergestellt. Die Region 10200 bis 9771 wurde mit den Primern PR7 (SEQ ID NO: 33) und Primern PR9 (SEQ ID NO: 35) amplifiziert (Amplifikat A7/9), die Region 9526 bis 9285 wurde mit den PR8 (SEQ ID NO: 34)

und PR10 (SEQ ID NO: 36) amplifiziert (Amplifikat A8/10).

[0335] Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR-Reaktionen zur Amplifikation der DNA-Fragmente, die die Regionen Region 10200-9771 und Region 9526 bis 9285 des AP3 Promoters beinhalten, erfolgte in 50 µl Reaktionsansätzen, in denen enthalten war:

- 100 ng AP3 Amplifikat (oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM sense Primer (PR7 SEQ ID NO: 33 bzw. PR8 SEQ ID NO: 34)
- 0.2 mM antisense Primer (PR9 SEQ ID NO: 35 bzw. PR10 SEQ ID NO: 36)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 µl Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28.8 µl Aq. Dest.

[0336] Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94_C	2 Minuten
35X	94_C	1 Minute
	50_C	1 Minute
	72_C	1 Minute
1X	72_C	10 Minuten

[0337] Die rekombinante PCR beinhaltet Annealing der sich über eine Sequenz von 25 Nukleotiden überlappenden Amplifikate A7/9 und A8/10, Vervollständigung zu einem Doppelstrang und anschließende Amplifizierung. Dadurch entsteht eine modifizierte Version des AP3 Promoters, AP3P, in dem die Positionen 9670 bis 9526 deletiert sind. Die Denaturierung (5 min bei 95 °C) und Annealing (langsame Abkühlung bei Raumtemperatur auf 40 °C) beider Amplifikate A7/9 und A8/10 erfolgte in einem 17.6 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 0.5 mg A7/9 Amplifikat
- 0.25 mg A8/10 Amplifikat

[0338] Das Auffüllen der 3'Enden (30 min bei 30\_C) erfolgte in einem 20 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 17.6 µl A7/9 und A8/10-Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 50 mM dNTPs
- 2 µl 1X Klenow Puffer
- 2U Klenow Enzym

[0339] Die Nukleinsäure codierend für die modifizierte Promoterversion AP3P wurde mittels PCR unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR7 SEQ ID NO: 33) und eines antisense spezifischen Primers (PR10 SEQ ID NO: 36) amplifiziert.

[0340] Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des AP3P Fragmentes erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR7 (SEQ ID NO: 33)
- 0.2 mM PR10 (SEQ ID NO: 36)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 µl Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28.8 µl Aq. Dest.

[0341] Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94_C	2 Minuten
35X	94_C	1 Minute
	50_C	1 Minute
	72_C	1 Minute
1X	72_C	10 Minuten

[0342] Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID NO: 33 und SEQ ID NO: 36 resultierte in einem 778 Bp Fragment das für die modifizierte Promoterversion AP3P codiert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit den Primern T7 und M13 bestätigten eine zur Sequenz AL132971, Region 10200 bis 9298 identische Sequenz, wobei die interne Region 9285 bis 9526 deletiert wurde. Diese Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

[0343] Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 771 Bp SacI-HindIII Fragmentes aus pTAP3P und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der den Promoter AP3P anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heisst pJAP3P.

[0344] Zur Herstellung einer Expressionskassette pJAP3PKETO2 wurde das 1027 Bp SpHI-Fragment KETO2 in den SpHI geschnittenen Vektor pJAP3P kloniert. Der Klon, der das Fragment KETO2 in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJAP3PKETO2.

[0345] Zur Herstellung einer Expressionskassette pJAP3PKETO4 wurde das 1032 Bp SpHI-EcoRI Fragment KETO4 (in Beispiel 3 beschrieben) in den SpHI-EcoRI geschnittenen Vektor pJAP3P kloniert. Der Klon, der das Fragment KETO4 in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJAP3PKETO4.

[0346] Die Herstellung einer Expressionsvektors für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der AP3P-kontrollierten Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

[0347] Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5AP3PKETO2 wurde das 2.8 KB by SacI-XhoI Fragment aus pJAP3PKETO2 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert ( **Abb. 4**, Konstruktkarte). In der **Abb. 4** beinhaltet Fragment AP3P den modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment rbcS das rbcS Transitpeptid aus Erbse (204 bp), Fragment KE-T02 (1027 bp) die gesamte Primärsequenz codierend für die *Haematococcus pluvialis* Ketolase, Fragment term (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV

#### Beispiel I.5.B:

Herstellung von Expressionsvektoren zur konstitutiven Expression der Nostoc sp. PCC 7120 Ketolase in *Tagetes erecta*.

[0348] Die Expression der Ketolase aus Nostoc in *Tagetes erecta* erfolgte unter Kontrolle des konstitutiven Promoters FNR (Ferredoxin NADPH Oxidoreductase) aus *Arabidopsis thaliana*. Die Expression erfolgte mit dem Transitpeptid rbcS aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715).

[0349] Das DNA Fragment, das die FNR Promotorregion -635 bis -1 aus *Arabidopsis thaliana* beinhaltet, wurde mittels PCR unter Verwendung genomischer DNA (nach Standardmethoden aus *Arabidopsis thaliana* isoliert) sowie der Primer FNR-1 (SEQ ID No.90) und FNR-2 (SEQ ID No. 91) hergestellt.

[0350] Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die das FNR-Promotorfragment FNR1-2 (-635 bis -1) beinhaltet, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 100 ng genomischer DNA aus *A.thaliana*
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM FNR-1 (SEQ ID No. 90)
- 0.2 mM FNR-2 (SEQ ID No. 91)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 µl Pfu Polymerase (Stratagene)
- 28.8 µl Aq. Dest.

[0351] Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94°C	2 Minuten
35X	94°C	1 Minute
	50°C	1 Minute
	72°C	1 Minute
1X	72°C	10 Minuten

[0352] Das 653 by Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pFNR erhalten.

[0353] Sequenzierung des Klons pFNR bestätigte eine Sequenz, die mit einem Sequenzabschnitt auf Chromosom 5 von *Arabidopsis thaliana* (Datenbankeintrag A8011474)



von Position 70127 bis 69493 übereinstimmt. Das Gen beginnt bei Basenpaar 69492 und ist mit "Ferredoxin-NADP + Reductase" annotiert.

[0354] Dieser Klon heisst pFNR und wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

[0355] Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 635 by SacI-HindIII Fragmentes aus pFNR und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der den Promoter FNR anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heisst pJITFNR.

[0356] Zur Herstellung einer Expressionskassette pJFNRNOST wurde das 805 by SphI-Fragment NOSTF-G (in Beispiel 1 beschrieben) in den SphI geschnittenen Vektor pJITFNR kloniert. Der Klon, der das Fragment NOSTF-G in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJFNRNOST.

[0357] Die Herstellung einer Expressionskassette für die Agrobacterium-vermittelte Transformation des Expressionsvektor mit der Ketolase aus Nostoc in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

[0358] Zur Herstellung des *Tagetes*-Expressionsvektors pS5FNRNOST wurde das 2.4 Kb SacI-XhoI Fragment (partielle SacI Hydrolyse) aus pJFNRNOST mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (**Abb. 5**, Konstruktkarte). In der **Abb. 5** beinhaltet Fragment FNR Promotor den duplizierten FNR Promotor (655 bp), Fragment rbcS Transit Peptid das rbcS Transitpeptid aus Erbse (204 bp), Fragment Nost Ketolase (799 bp) die gesamte Primärsequenz, kodierend für die Nostoc Ketolase, Fragment 35S Terminator (761 bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

#### Beispiel I.5C:

Herstellung von Expressionsvektoren zur blütenesspezifischen Expression der Nostoc sp. PCC 7120 Ketolase in *Tagetes erecta*.

[0359] Die Expression der Ketolase aus Nostoc in *Tagetes erecta* erfolgte mit dem Transitpeptid rbcS aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715). Die Expression erfolgte unter Kontrolle einer modifizierten Version AP3P des blütenesspezifischen Promoters AP3 aus *Arabidopsis thaliana* (AL132971: Nukleotidregion 9298-10200; Hill et al. (1998) Development 125: 1711-1721).

[0360] Das DNA Fragment, das die AP3 Promoterregion -902 bis +15 aus *Arabidopsis thaliana* beinhaltet, wurde mittels PCR unter Verwendung genomischer DNA (nach Standardmethoden aus *Arabidopsis thaliana* isoliert) sowie der Primer AP3-1 (SEQ ID No.93) und AP3-2 (SEQ ID No. 94) hergestellt.

[0361] Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die das AP3-Promoterfragment (-902 bis +15) beinhaltet, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 100 ng genomischer DNA aus *A.thaliana*
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM AP3-1 (SEQ ID No. 93)
- 0.2 mM AP3-2 (SEQ ID No. 94)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 µl Pfu Polymerase (Stratagene)
- 28.8 µl Aq. Dest.

[0362] Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94°C	2 Minuten
35X	94°C	1 Minute
	50°C	1 Minute
	72°C	1 Minute

1X	72°C	10 Minuten
----	------	------------

[0363] Das 929 Bp Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pAP3 erhalten.

[0364] Sequenzierung des Klons pAP3 bestätigte eine Sequenz, die sich lediglich in durch eine Insertion (ein G in Position 9765 der Sequenz AL132971) und einen Basenaustausch (ein G statt ein A in Position 9726 der Sequenz AL132971) von der publizierten AP3 Sequenz (AL132971, Nukleotidregion 9298-10200) unterschei-

det. Diese Nukleotidunterschiede wurden in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentieren somit die tatsächliche Nukleotidsequenz in den verwendeten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen.

[0365] Die modifizierte Version AP3P wurde mittels rekombinanter PCR unter Verwendung des Plasmids pAP3 hergestellt. Die Region 10200-9771 wurde mit den Primern AP3-1 (SEQ ID No. 93) und Primern AP3-4 (SEQ ID No. 96) amplifiziert (Amplifikat A1/4), die Region 9526-9285 wurde mit den AP3-3 (SEQ ID No. 95) und AP3-2 (SEQ ID No. 94) amplifiziert (Amplifikat A2/3).

[0366] Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR-Reaktionen zur Amplifikation der DNA-Fragmente, die die Regionen Region 10200-9771 und Region 9526-9285 des AP3 Promoters beinhalten, erfolgte in 50 µl Reaktionsansätzen, in denen enthalten war:

- 100 ng AP3 Amplifikat (oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM sense Primer (AP3-1 SEQ ID No. 93 bzw. AP3-3 SEQ ID No. 95)
- 0.2 mM antisense Primer (AP3-4 SEQ ID No. 96 bzw. AP3-2 SEQ ID No. 94)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 µl Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28.8 µl Aq. Dest.

[0367] Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94°C	2 Minuten
35X	94°C	1 Minute
	50°C	1 Minute
	72°C	1 Minute
1X	72°C	10 Minuten

[0368] Die rekombinante PCR beinhaltet Annealing der sich über eine Sequenz von 25 Nukleotiden überlappenden Amplifikate A1/4 und A2/3, Vervollständigung zu einem Doppelstrang und anschließende Amplifizierung. Dadurch entsteht eine modifizierte Version des AP3 Promoters, AP3P, in dem die Positionen 9670-9526 deletiert sind. Die Denaturierung (5 min bei 95°C) und Annealing (langsame Abkühlung bei Raumtemperatur auf 40°C) beider Amplifikate A1/4 und A2/3 erfolgte in einem 17.6 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 0.5 µg A1/4 Amplifikat
- 0.25 µg A2/3 Amplifikat

[0369] Das Auffüllen der 3'-Enden (30 min bei 30°C) erfolgte in einem 20 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 17.6 µl A1/4 und A2/3-Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 50 µM dNTPs
- 2 µl 1X Klenow Puffer
- 2U Klenow Enzym

[0370] Die Nukleinsäure kodierend für die modifizierte Promoterversion AP3P wurde mittels PCR unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (AP3-1 SEQ ID No. 93) und eines antisense spezifischen Primers (AP3-2 SEQ ID No. 94) amplifiziert.

[0371] Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des AP3P Fragmentes erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM AP3-1 (SEQ ID No. 93)
- 0.2 mM AP3-2 (SEQ ID No. 94)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 µl Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28.8 µl Aq. Dest.

[0372] Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94°C	2 Minuten
35X	94°C	1 Minute

50°C 1 Minute  
 72°C 1 Minute  
 1X 72°C 10 Minuten

[0373] Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID No. 93 (AP3-1) und SEQ ID No. 94 (AP3-2) resultierte in einem 783 Bp Fragment, das für die modifizierte Promoterversion AP3P kodiert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pAP3P erhalten. Sequenzierungen mit den Primern T7 und M13 bestätigten eine zur Sequenz AL132971, Region 10200-9298 identische Sequenz, wobei die interne Region 9285-9526 deletiert wurde. Diese Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

[0374] Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 783 Bp SacI-HindIII Fragmentes aus pAP3P und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der den Promoter AP3P anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heisst pJITAP3P. Zur Herstellung einer Expressionskassette pJAP3NOST wurde das 805 Bp SpHI-Fragment NOSTF-G (in Beispiel 1 beschrieben) in den SpHI geschnittenen Vektor pJITAP3P kloniert. Der Klon, der das Fragment NOSTF-G in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJAP3NOST.

[0375] Die Herstellung einer Expressionsvektors für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der AP3P-kontrollierten Ketolase aus Nostoc in Tagetes erecta erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

[0376] Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5AP3NOST wurde das 2.6 KB by SacI-XhoI (partielle SacI Hydrolyse) Fragment aus pS5AP3NOST mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (**Abb. 6**, Konstruktkarte). In der **Abb. 6** beinhaltet Fragment AP3P den modifizierten AP3P Promoter (783 bp), Fragment rbcS das rbcS Transitpeptid aus Erbse (207 bp), Fragment NOSTF-G (792 bp) die gesamte Primärsequenz codierend für die Nostoc Ketolase, Fragment term (795 bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

#### Beispiel I.6:

#### Herstellung transgener Tagetes Pflanzen

[0377] Tagetessamen werden sterilisiert und auf Keimungsmedium (MS-Medium; Murashige and Skoog, Physiol. Plant. 15(1962), 473-497) pH 5,8, 2 % Saccharose) aufgelegt. Die Keimung erfolgt in einem Temperatur/Licht/Zeitintervall von 18 bis 28\_C/20-200 mE/3 bis 16 Wochen, bevorzugt jedoch bei 21\_C, 20 bis 70 mE, für 4 bis 8 Wochen.

[0378] Alle Blätter der sich bis dahin entwickelten in vitro Pflanzen werden geerntet und quer zur Mittelrippe geschnitten. Die dadurch entstehenden Blattexplantate mit einer Größe von 10 bis 60 mm<sup>2</sup> werden im Verlaufe der Präparation in flüssigem MS-Medium bei Raumtemperatur für maximal 2 h aufbewahrt.

[0379] Ein beliebiger Agrobacterium tumefaciens Stamm, bevorzugt aber ein supervirulenter Stamm, wie z.B. EHA105 mit einem entsprechenden Binärplasmid, das ein Selektionsmarkergen (bevorzugt bar oder pat) sowie ein oder mehrere Trait- oder Reportergene tragen kann wird (beispielsweise pS5KETO2 und pS5AP3PKETO2), über Nacht angezogen und für die Co-Kultivierung mit dem Blattmaterial verwendet. Die Anzucht des Bakterienstammes kann wie folgt erfolgen: Eine Einzelkolonie des entsprechenden Stammes wird in YEB (0,1 % Hefeextrakt, 0,5 Rindfleischextrakt, 0,5 % Pepton, 0,5 % Saccharose, 0,5 % Magnesiumsulfat × 7 H<sub>2</sub>O) mit 25 mg/l Kanamycin angeimpft und bei 28 C für 16 bis 20 h angezogen. Anschließend wird die Bakteriensuspension durch Zentrifugation bei 6000 g für 10 min geerntet und derart in flüssigem MS Medium resuspendiert, dass eine OD<sub>600</sub> von ca. 0,1 bis 0,8 entstand. Diese Suspension wird für die C-Kultivierung mit dem Blattmaterial verwendet.

[0380] Unmittelbar vor der Co-Kultivierung wird das MS-Medium, in dem die Blätter aufbewahrt worden sind, durch die Bakteriensuspension ersetzt. Die Inkubation der Blättchen in der Agrobakteriensuspension erfolgte für 30 min unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur. Anschließend werden die infizierten Explantate auf ein mit Agar (z.B. 0,8 % Plant Agar (Duchefa, NL) verfestigtes MS-Medium mit Wachstumsregulatoren, wie beispielsweise 3 mg/l Benrylaminopurin (BAP) sowie 1 mg/l Indolylessigsäure (IAA) aufgelegt. Die Orientierung der Blätter auf dem Medium ist bedeutungslos. Die Kultivierung der Explantate findet für 1 bis 8 Tage, bevorzugt aber für 6 Tage statt, dabei können folgende Bedingungen angewendet werden: Lichtintensität: 30 bis 80 mMol/m<sup>2</sup> × sec, Temperatur: 22 bis 24°C, hell/dunkel Wechsel von 16/8 Stunden. Anschließend werden die co-kultivierten Explantate auf frisches MS-Medium, bevorzugt mit den gleichen Wachstumsregulatoren übertragen, wobei dieses zweite Medium zusätzlich ein Antibiotikum zur Unterdrückung des Bakterienwachstums enthält. Timentin in einer Konzentration von 200 bis 500 mg/l ist für diesen Zweck sehr geeignet. Als zweite selektive Komponente wird eine für die Selektion des Transformationserfolges eingesetzt. Phosphinothricin in

einer Konzentration von 1 bis 5 mg/l selektiert sehr effizient, aber auch andere selektive Komponenten gemäß des zu verwendenden Verfahrens sind denkbar.

[0381] Nach jeweils ein bis drei Wochen erfolgt der Transfer der Explantate auf frisches Medium bis sich Sprossknospen und kleine Sprosse entwickeln, die dann auf das gleiche Basalmedium einschließlich Timentin und PPT oder alternative Komponenten mit Wachstumsregulatoren, nämlich z.B. 0,5 mg/l Indolylbuttersäure (IBA) und 0,5 mg/l Gibberillinsäure  $GA_3$ , zur Bewurzelung übertragen werden. Bewurzelte Sprosse können ins Gewächshaus überführt werden.

[0382] Zusätzlich zu der beschriebenen Methode sind folgende vorteilhafte Modifikationen möglich:

- Bevor die Explantate mit den Bakterien infiziert werden, können sie für 1 bis 12 Tage, bevorzugt 3 bis 4, auf das oben beschriebene Medium für die Co-Kultur vorinkubiert werden. Anschließend erfolgt die Infektion, Co-Kultur und selektive Regeneration wie oben beschrieben.
- Der pH Wert für die Regeneration (normalerweise 5,8) kann auf pH 5,2 gesenkt werden. Dadurch wird die Kontrolle des Agrobakterienwachstums verbessert.
- Die Zugabe von  $AgNO_3$  (3-10 mg/l) zum Regenerationsmedium verbessert den Zustand der Kultur einschließlich der Regeneration selbst.
- Komponenten, die die Phenolbildung reduzieren und dem Fachmann bekannt sind, wie z.B. Zitronensäure, Ascorbinsäure, PVP u.v.a.m., wirken sich positiv auf die Kultur aus.
- Für das gesamte Verfahren kann auch flüssiges Kulturmedium Verwendung finden. Die Kultur kann auch auf handelsüblichen Trägern, die auf dem flüssigen Medium positioniert werden inkubiert werden.

[0383] Gemäß der oben beschriebenen Transformationsmethode wurden mit folgenden Expressionskonstrukten folgende Linien erhalten:

Mit pS5KETO2 wurde beispielsweise erhalten: cs18-1 und cs18-2, mit pS5AP3PKETO2 wurde beispielsweise erhalten: cs19-1, cs19-2 und cs19-3.

Mit pS5FNRNOST wurde beispielsweise erhalten: ms 103-1, ms103-2, ms103-3, mit pS5AP3NOST wurde beispielsweise erhalten: ms 104-1, ms104-2, ms104-3.

#### Beispiel I.8

[0384] Charakterisierung der transgenen Pflanzenblüten

##### Beispiel I.8.1

#### Trennung von Carotinoidestern in Blütenblättern transgener Pflanzen

[0385] Allgemeine Arbeitsvorschrift:

Die Blütenblätter der transgenen Pflanzen werden in flüssigem Stickstoff gemörsert und das Petalenpulver (etwa 40 mg) mit 100 % Aceton extrahiert (dreimal je 500 ml). Das Lösungsmittel wird evaporiert und die Carotinoide in 100 bis 200 ml Petrolether/Aceton (5:1, v/v) resuspendiert.

[0386] Die Carotinoide werden in konzentrierter Form mittels Dünnschicht-Chromatographie (TLC) auf Silica60 F254- Platten (Merck) in einem organischen Laufmittel (Petrolether/Aceton; 5:1) entsprechend ihrer Phobizität aufgetrennt. Gelbe (Xanthophyllester), rote (Ketocarotinoidester) und orange Banden (Mischung aus Xanthophyll- und Ketocarotinoidestern) auf der TLC werden ausgekratzt.

[0387] Die an Silica gebundenen Carotinoide werden dreimal mit 500 ml Aceton eluiert, das Lösungsmittel evaporiert und die Carotinoide mittels HPLC aufgetrennt und identifiziert.

[0388] Mittels einer C30-reverse phase-Säule kann zwischen Mono- und Diestern der Carotinoide unterschieden werden. HPLC-Laufbedingungen waren nahezu identisch mit einer publizierten Methode (Frazer et al.(2000), Plant Journal 24(4): 551-558). Eine Identifizierung der Carotinoide ist aufgrund der UV-VIS-Spektren möglich:

#### Beispiel I.9

#### Enzymatische Hydrolyse von Carotinoidestern und Identifizierung der Carotinoide

##### Allgemeine Arbeitsvorschrift

[0389] Gemörsertes Petalenmaterial (50 bis 100 mg Frischgewicht) wird mit 100 % Aceton (dreimal 500 ml; jeweils etwa 15 Minuten schütteln) extrahiert. Das Lösungsmittel wird evaporiert. Carotinoide werden anschließend in 400 ml Aceton aufgenommen (Absorption bei 475 nm zwischen 0,75 und 1,25) und 5 min im Ultraschall-Bad behandelt. Der Carotinoid-Extrakt wird mit 300 ml 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,0) gemischt und 5

bis 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach erfolgt die Zugabe von 100 bis 200 ml Cholesterol-Esterase (Stamm-lösung: 6,8 units/ml einer Cholesterol-Esterase von *Pseudomonas spec.*). Nach 8 bis 1 Stunden wird nochmals 100 bis 200 ml Enzym zugegeben; Hydrolyse der Ester erfolgt innerhalb von 24 Stunden bei Inkubation bei 37°C. Nach Zugabe 0,35 g  $\text{Na}_2\text{SO}_4 \times 10\text{H}_2\text{O}$  und 500 ml Petrolether wird gut gemischt und zentrifugiert (3 Minuten; 4500 g). Petrolether-Phase wird abgezogen und nochmals mit 0,35 g  $\text{Na}_2\text{SO}_4 \times 10\text{H}_2\text{O}$  (anhydrous) gemischt. Zentrifugation für 1 Minute bei 10000 g. Petrolether wird evaporiert und freie Carotinoide werden in 100 bis 120 ml Aceton aufgenommen. Mittels HPLC und C30-reverse phase-Säule können freie Carotinoide aufgrund von Retentionszeit und UV-VIS-Spektren identifiziert werden.

#### Beispiel I.10:

Herstellung eines Klonierungsvektors zur Herstellung von Inverted-Repeat-Expressionskassetten für die blüten-spezifischen Expression von Epsilon-cyclase dsRNAs in *Tagetes erecta*

[0390] Die Expression von Inverted-Repeat Transkripten bestehend aus Fragmenten der Epsilon-Cyclase in *Tagetes erecta* erfolgte unter Kontrolle einer modifizierten Version AP3P des blütenspezifischen Promoters AP3 aus *Arabidopsis thaliana* (AL132971: Nukleotidregion 9298 bis 10200; Hill et al. (1998) *Development* 125: 1711 bis 1721).

[0391] Das Inverted-Repeat Transkript enthält jeweils ein Fragment in korrekter Orientierung (Sense-Fragment) und ein sequenzidentisches Fragment in entgegengesetzter Orientierung (Antisense-Fragment), die durch ein funktionelles Intron, das PIV2 Intron des ST-LH1 Genes aus Kartoffel (Vancanneyt G. et al. (1990) *Mol Gen Genet* 220: 245-50) mit einander verbunden sind.

[0392] Die cDNA, die für den AP3 Promoter (-902 bis +15) aus *Arabidopsis thaliana* codiert, wurde mittels PCR unter Verwendung genomischer DNA (nach Standardmethode aus *Arabidopsis thaliana* isoliert) und der Primer PR7 (SEQ ID NO: 49) und PR10 (SEQ ID NO: 52) hergestellt.

[0393] Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die das AP3-Promoterfragment (-902 bis +15) codiert, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 ml genomischer DNA aus *A.thaliana* (1:100 verd hergestellt wie oben beschrieben)
- 0,25 mM dNTPs
- 0,2 mM PR7 (SEQ ID NO: 49)
- 0,2 mM PR10 (SEQ ID NO: 52)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0,25 ml Pfu Polymerase (Stratagene)
- 28,8 ml Aq. Dest.

[0394] Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94_C	2 Minuten
35X	94_C	1 Minute
	50_C	1 Minute
	72_C	1 Minute
1X	72_C	10 Minuten

[0395] Das 922 Bp Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pTAP3 erhalten. Sequenzierung des Klons pTAP3 bestätigte eine Sequenz, die sich lediglich in durch eine Insertion (ein G in Position 9765 der Sequenz AL132971) und einen Basenaustausch (ein G statt ein A in Position 9726 der Sequenz AL132971) von der publizierten AP3 Sequenz (AL132971, Nukleotidregion 9298 bis 10200) unterscheidet (Position 33: T statt G, Position 55: T statt G). Diese Nukleotidunterschiede wurden in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentieren somit die Nukleotidsequenz in der verwendeten *Arabidopsis thaliana* Pflanze.

[0396] Die modifizierte Version AP3P wurde mittels rekombinanter PCR unter Verwendung des Plasmids pTAP3 hergestellt. Die Region 10200 bis 9771 wurde mit den Primern PR7 (SEQ ID NO: 49) und Primern PR9 (SEQ ID NO: 51) amplifiziert (Amplifikat A7/9), die Region 9526 bis 9285 wurde mit den PR8 (SEQ ID NO: 50) und PR10 (SEQ ID NO: 52) amplifiziert (Amplifikat A8/10).

[0397] Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR-Reaktionen zur Amplifikation der DNA-Fragmente, die für die Regionen Region 10200 bis 9771 und 9526 bis 9285 des AP3 Promoters codieren, erfolgte in 50 ml Reaktionsansätzen, in denen enthalten war:

- 100 ng AP3 Amplifikat (oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR7 (SEQ ID NO: 49) bzw. PR8 (SEQ ID NO: 50)
- 0.2 mM PR9 (SEQ ID NO: 51) bzw. PR10 (SEQ ID NO: 52)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 ml Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28.8 ml Aq. Dest.

[0398] Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94_C	2 Minuten
35X	94_C	1 Minute
	50_C	2 Minuten
	72_C	3 Minuten
1X	72_C	10 Minuten

[0399] Die rekombinante PCR beinhaltet Annealing der sich über eine Sequenz von 25 Nukleotiden überlappenden Amplifikate A7/9 und A8/10, Vervollständigung zu einem Doppelstrang und anschließende Amplifizierung. Dadurch entsteht eine modifizierte Version des AP3 Promoters, AP3P, in dem die Positionen 9670 bis 9526 deletiert sind. Die Denaturierung (5 min bei 95\_C) und Annealing (langsame Abkühlung bei Raumtemperatur auf 40\_C) beider Amplifikate A7/9 und A8/10 erfolgte in einem 17.6 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 0.5 mg A7/9
- 0.25 mg A8/10

[0400] Das Auffüllen der 3'Enden (30 min bei 30\_C) erfolgte in einem 20 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 17.6 ml A7/9 und A8/10-Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 50 mM dNTPs
- 2 ml 1X Klenow Puffer
- 2U Klenow Enzym

[0401] Die Nukleinsäure codierend für die modifizierte Promoterversion AP3P wurde mittels PCR unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR7 SEQ ID NO: 49) und eines antisense spezifischen Primers (PR10 SEQ ID NO: 52) amplifiziert.

[0402] Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des AP3P Fragmentes erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 ml Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR7 (SEQ ID NO: 49)
- 0.2 mM PR10 (SEQ ID NO: 52)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 ml Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28.8 ml Aq. Dest.

[0403] Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94_C	2 Minuten
35X	94_C	1 Minute
	50_C	1 Minuten
	72_C	1 Minuten
1X	72_C	10 Minuten

[0404] Die PCR-Amplifikation mit PR7, SEQ ID NO: 49 und PR10 SEQ ID NO: 52 resultierte in einem 778 Bp Fragment das für die modifizierte Promoterversion AP3P codiert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit den Primern T7 und M13 bestätigten eine zur Sequenz

AL132971, Region 10200 bis 9298 identische Sequenz, wobei die interne Region 9285 bis 9526 deletiert wurde. Diese Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

[0405] Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 771 Bp SacI-HindIII Fragmentes aus pTAP3P und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der den Promoter AP3P anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heisst pJAP3P.

[0406] Ein DNA-Fragment, das das PIV2 Intron des Gens ST-LS1 enthält wurde mittels PCR unter Verwendung von Plasmid-DNA p35SGUS INT (Vancanneyt G. et al. (1990) Mol Gen Genet 220: 245-50) sowie der Primer PR40 (Seq ID NO: 54) und Primer PR41 (Seq ID NO: 55) hergestellt.

[0407] Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der Sequenz des Intron PIV2 des Gens ST-LS1, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 ml p35SGUS INT
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR40 (SEQ ID NO: 54)
- 0.2 mM PR41 (SEQ ID NO: 55)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 ml Aq. Dest.

[0408] Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94_C	2 Minuten
35X	94_C	1 Minute
	53_C	1 Minuten
	72_C	1 Minuten
1X	72_C	10 Minuten

[0409] Die PCR-Amplifikation mit PR40 und PR41 resultierte in einem 206 Bp-Fragment. Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Amplifikat in den PCR-Klonierungsvektor pBluntII (Invitrogen) kloniert und der Klon pBluntII-40-41 erhalten. Sequenzierungen dieses Klons mit dem Primer SP6 bestätigte eine Sequenz, die identisch ist mit der entsprechenden Sequenz aus dem Vektor p35SGUS INT.

[0410] Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Vektor pJAP3P (oben beschrieben).

[0411] Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 206 Bp Sall-BamHI Fragmentes aus pBluntII-40-41 und Ligierung mit dem Sall-BamHI geschnittenen Vektor pJAP3P. Der Klon, der das Intron PIV2 des Gens ST-LS1 in der korrekten Orientierung anschließend an das 3'Ende des rbcS Transitpeptides enthält, heisst pJAI1 und ist geeignet, Expressionskassetten für die blütenspezifische Expression von Inverted-Repeat Transkripten herzustellen.

[0412] In der **Abb. 7** beinhaltet Fragment AP3P den modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment rbcS das rbcS Transitpeptid aus Erbse (204 bp), Fragment Intron das Intron PIV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1, und Fragment term (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

#### Beispiel I.11

Herstellung von Inverted-Repeat-Expressionskassetten für die blütenspezifische Expression von Epsilon-cyclase dsRNAs in *Tagetes erecta* (gerichtet gegen die 5'Region der Epsilon-Cyclase cDNA)

[0413] Die Nukleinsäure, die die 5'terminale 435bp Region der Epsilon-Cyclase cDNA (Genbank accession NO: AF251016) enthält, wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Tagetes erecta* cDNA unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR42 SEQ ID NO: 56) und eines antisense spezifischen Primers (PR43 SEQ ID NO: 57) amplifiziert. Die 5'terminale 435 by Region der Epsilon-Cyclase cDNA aus *Tagetes erecta* setzt sich zusammen aus 138 by 5'Nichttranslatierter Sequenz (5'UTR) und 297 by der dem N-Terminus entsprechenden kodierenden Region.

[0414] Für die Präparation von Total-RNA aus Blüten von *Tagetes* wurden 100mg der gefrorenen, pulverisierten Blüten in ein Reaktionsgefäß überführt und in 0.8 ml Trizol-Puffer (LifeTechnologies) aufgenommen. Die Suspension wurde mit 0.2 ml Chloroform extrahiert. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 12000 g wurde der wässrige Überstand abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumen Ethanol extrahiert. Die RNA wurde mit einem Volumen Isopropanol gefällt, mit 75% Ethanol gewaschen und das Pellet in DEPC Wasser (über Nacht Inkubation von Wasser mit 111000 Volumen Diethylpyrocarbonat bei Raumtem-

peratur, anschließend autoklaviert) gelöst. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt. Für die cDNA-Synthese wurden 2.5 µg Gesamt-RNA für 10 min bei 60°C denaturiert, für 2 min auf Eis abgekühlt und mittels eines cDNA-Kits (Ready-to-go-you-prime-beads, Pharmacia Biotech) nach Herstellerangaben unter Verwendung eines antisense spezifischen Primers (PR17 SEQ ID NO: 53) in cDNA umgeschrieben.

[0415] Die Bedingungen der anschließenden PCR-Reaktionen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des PR42-PR43 DNA-Fragmentes, das die 5'terminale 435bp Region der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR42 (SEQ ID NO: 56)
- 0.2 mM PR43 (SEQ ID NO: 57)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 µl Aq. Dest.

[0416] Die PCR zur Amplifikation des PR44-PR45 DNA-Fragmentes, das die 5'terminale 435 by Region der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR44 (SEQ ID NO: 58)
- 0.2 mM PR45 (SEQ ID NO: 59)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 µl Aq. Dest.

[0417] Die PCR-Reaktionen wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94_C	2 Minuten
35X	94_C	1 Minute
	58_C	1 Minuten
	72_C	1 Minuten
1X	72_C	10 Minuten

[0418] Die PCR-Amplifikation mit Primer PR42 und PR43 resultierte in einem 443 Bp-Fragment, die PCR-Amplifikation mit Primer PR44 und PR45 resultierte in einem 444 Bp-Fragment.

[0419] Die beiden Amplifikate, das PR42-PR43 (HindIII-Sall sense) Fragment und das PR44-PR45 (EcoRI-BamHI antisense) Fragment, wurden unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit dem Primer SP6 bestätigten jeweils eine zur publizierten Sequenz AF251016 (SEQ ID NO: 38) identische Sequenz abgesehen von den eingeführten Restriktionsstellen. Diese Klone wurden daher für die Herstellung eines Inverted-Repeat Konstrukts in dem Klonierungsvektor pJAI1 (siehe Beispiel I.10) verwendet.

[0420] Der erste Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 444 Bp PR44-PR45 BamHI-EcoRI Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem BamHI-EcoRI geschnittenen Vektor pJAI1. Der Klon, der 5'terminale Region der Epsilon-Cyclase in der antisense Orientierung enthält, heisst pJAI2. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem antisense Fragment der 5'terminale Region der Epsilon-Cyclase und dem Polyadenylierungssignal aus CaMV.

[0421] Der zweite Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 443 Bp PR42-PR43 HindIII-Sall Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem HindIII-Sall geschnittenen Vektor pJAI2. Der Klon, der 435 by 5'terminale Region der Epsilon-Cyclase cDNA in der sense Orientierung enthält, heisst pJAI3. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem AP3P und dem sense Fragment der 5'terminale Region der Epsilon-Cyclase.

[0422] Für die Herstellung einer Inverted-Repeat Expressionskassette unter Kontrolle des CHRC-Promoters wurde ein CHRC-Promoterfragment unter Verwendung genomischer DNA aus Petunie (nach Standardmethoden hergestellt) sowie der Primer PRCHRC5 (SEQ ID NO: 76) und PRCHRC3 (SEQ ID NO: 77) amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen des resultierenden Klons pCR2.1-CHRC mit den Primern M13 und T7 bestätigten eine zur Sequenz AF099501 identische Sequenz. Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJAI3 verwendet.

[0423] Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1537 by SacI-HindIII Fragments aus pCR2.1-CHRC und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJAI3. Der Klon, der den Promoter CHRC anstelle des ur-



sprünglichen Promoters AP3P enthält heisst pJCI3.

[0424] Die Herstellung der Expressionsvektoren für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der AP3P- bzw. CHRC-kontrollierten Inverted-Repeat Transkripts in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

[0425] Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5AI3 wurde das 2622 by SacI-XhoI Fragment aus pJAI3 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (**Abb. 8**, Konstruktkarte).

[0426] In der **Abb. 8** beinhaltet Fragment AP3P den modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment 5sense die 5'Region der Epsilon-Cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in Sense-Orientierung, Fragment Intron das Intron PIV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1, Fragment 5anti die 5'Region der Epsilon- cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in antisense Orientierung, und Fragment term (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

[0427] Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5CI3 wurde das 3394 by SacI-XhoI Fragment aus pJCI3 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (**Abb. 9**, Konstruktkarte).

[0428] In der **Abb. 9** beinhaltet Fragment CHRC den Promoter (1537 bp), Fragment 5sense die 5'Region der Epsilon-Cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in Sense-Orientierung, Fragment intron das Intron PIV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1, Fragment 5anti die 5'Region der Epsilon-Cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in Antisense-Orientierung, und Fragment term (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

### Beispiel I.12

Herstellung einer Inverted-Repeat-Expressionskassette für die blütenspezifische Expression von Epsilon-cyclase dsRNAs in *Tagetes erecta* (gerichtet gegen die 3'Region der Epsilon-Cyclase cDNA)

[0429] Die Nukleinsäure, die die 3'terminale Region (384 bp) der Epsilon-Cyclase cDNA (Genbank accession NO: AF251016) enthält wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Tagetes erecta* cDNA unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR46 SEQ ID NO: 60) und eines antisense spezifischen Primers (PR47 SEQ ID NO: 61) amplifiziert. Die 3'terminale Region (384 bp) der Epsilon-Cyclase cDNA aus *Tagetes erecta* setzt sich zusammen aus 140 by 3'-Nicht-translatierter Sequenz (3'UTR) und 244 by der dem C-Terminus entsprechenden kodierenden Region.

[0430] Die Präparation von Total-RNA aus Blüten von *Tagetes* erfolgte wie unter Beispiel I.11 beschrieben.

[0431] Die cDNA Synthese erfolgte wie unter Beispiel I.11 unter Verwendung des antisense spezifischen Primers PR17 (SEQ ID NO: 53) beschrieben.

[0432] Die Bedingungen der anschließenden PCR-Reaktionen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des PR46-PR457 DNA-Fragmentes, das die 3'terminale 384 by Region der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 ml cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR46 (SEQ ID NO: 60)
- 0.2 mM PR47 (SEQ ID NO: 61)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 ml Aq. Dest.

[0433] Die PCR zur Amplifikation des PR48-PR49 DNA-Fragmentes, das die 5'terminale 384 by Region der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 ml cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR48 (SEQ ID NO: 62)
- 0.2 mM PR49 (SEQ ID NO: 63)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 ml Aq. Dest.

[0434] Die PCR-Reaktionen wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94_C	2 Minuten
35X	94_C	1 Minute
	58_C	1 Minuten
	72_C	1 Minuten
1X	72_C	10 Minuten

[0435] Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID NO: 60 und SEQ ID NO: 61 resultierte in einem 392 Bp-Fragment, die PCR-Amplifikation mit SEQ ID NO: 62 und SEQ ID NO: 63 resultierte in einem 396 Bp-Fragment.

[0436] Die beiden Amplifikate, das PR46-PR47 Fragment und das PR48-PR49 Fragment, wurden unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit dem Primer SP6 bestätigten jeweils eine zur publizierten Sequenz AF251016 (SEQ ID NO: 38) identische Sequenz abgesehen von den eingeführten Restriktionsstellen. Diese Klone wurde daher für die Herstellung eines Inverted-Repeat Konstrukts in dem Klonierungsvektor pJAI1 (siehe Beispiel I.10) verwendet.

[0437] Der erste Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 396 Bp PR48-PR49 BamHI-EcoRI Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem BamHI-EcoRI geschnittenen Vektor pJAI1. Der Klon, der 3'terminale Region der Epsilon-Cyclase in der antisense Orientierung enthält, heisst pJAI4. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem Antisense-Fragment der 3'terminale Region der Epsilon-Cyclase und dem Polyadenylierungssignal aus CaMV.

[0438] Der zweite Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 392 Bp PR46-PR47 HindIII-Sall Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem HindIII-Sall geschnittenen Vektor pJAI4. Der Klon, der 392 by 3'terminale Region der Epsilon-Cyclase cDNA in der sense Orientierung enthält, heisst pJAI5. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem AP3P und dem Sense-Fragment 3'terminale Region der Epsilon-Cyclase.

[0439] Die Herstellung eines Expressionsvektors für die Agrobacterium-vermittelte Transformation des AP3P-kontrollierten Inverted-Repeat Transkripts in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900). Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5AI5 wurde das 2523 by SacI-XhoI Fragment aus pJAI5 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (**Abb. 10**, Konstruktkarte).

[0440] In der **Abb. 10** beinhaltet Fragment AP3P den modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment 3sense die 3'region der Epsilon cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in sense Orientierung, Fragment intron das Intron IV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1, Fragment 3anti die 3'region der Epsilon cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in antisense Orientierung, und Fragment term (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

### Beispiel I.13

#### Klonierung des Epsilon-Cyclase Promoters

[0441] Ein 199 by Fragment bzw. das 312 by Fragment des Epsilon-Cyclase Promoters wurde durch zwei unabhängige Klonierungsstrategien, Inverse PCR (adaptiert Long et al. Proc. Natl. Acad. Sci USA 90: 10370) und TAIL-PCR (Liu Y-G. et al. (1995) Plant J. 8: 457-463) unter Verwendung genomischer DNA (nach Standardmethode aus *Tagetes erecta*, Linie Orangenprinz, isoliert) isoliert.

[0442] Für den Inverse PCR-Ansatz wurden 2 ug genomische DNA in einem 25 ul Reaktionsansatz mit EcoRV und RsaI verdaut, anschließend auf 300 ml verdünnt und über Nacht bei 16°C mit 3U Ligase religiert. Unter Verwendung der Primer PR50 (SEQ ID NO: 64) und PR51 (SEQ ID NO: 65) wurde durch PCR Amplifikation ein Fragment hergestellt, das, jeweils in Sense-Orientierung, 354 by der Epsilon-Cyclase cDNA (Genbank Accession AF251016), ligiert an 300 by des Epsilon-Cyclase Promoters sowie 70 by des 5'terminalen Bereichs der cDNA Epsilon-Cyclase enthält (siehe **Abb. 11**).

[0443] Die Bedingungen der PCR-Reaktionen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des PR50-PR51 DNA-Fragmentes, das unter anderem das 312 by Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 ml Ligationsansatz (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR50 (SEQ ID NO: 64)
- 0.2 mM PR51 (SEQ ID NO: 65)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 ml Aq. Dest.

[0444] Die PCR-Reaktionen wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94_C	2 Minuten
35X	94_C	1 Minute
	53_C	1 Minute
	72_C	1 Minute
1X	72_C	10 Minuten

- [0445] Die PCR-Amplifikation mit Primer PR50 und PR51 resultierte in einem 734 Bp-Fragment, das unter anderem das 312 by Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält (**Abb. 11**).
- [0446] Das Amplifikat, wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit den Primern M13 und T7 ergaben die Sequenz SEQ ID NO: 45. Diese Sequenz wurde in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentiert somit die Nukleotidsequenz in der verwendeten Tagetes erecta Linie Orangenprinz.
- [0447] Für den TAIL-PCR Ansatz wurden drei sukzessive PCR-Reaktionen mit jeweils unterschiedlichen gen-spezifischen Primern (nested primers) durchgeführt.
- [0448] Die TAIL1-PCR erfolgte in einem 20 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:
- 1 ng genomische DNA (hergestellt wie oben beschrieben)
  - 0.2 mM jedes dNTPs
  - 0.2 mM PR60 (SEQ ID NO: 66)
  - 0.2 mM AD1 (SEQ ID NO: 69)
  - 2 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
  - 0.5 U R Taq Polymerase (TAKARA)
  - mit Aq. Dest. auf 20 ml aufgefüllt
- AD1 stellte dabei zunächst eine Mischung aus Primern der Sequenzen (a/c/g/t)tcga(g/c)t(a/t)t(g/c)g(a/t)gtt dar.
- [0449] Die PCR-Reaktion TAIL1 wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:
- 1X 93\_C: 1 Minute, 95\_C: 1 Minute  
 5X 94\_C: 30 Sekunden, 62\_C: 1 Minute, 72\_C: 2.5 Minuten  
 1X 94\_C: 30 Sekunden, 25\_C: 3 Minuten, ramp to 72\_C in 3 Minuten,  
 72\_C: 2.5 Minuten  
 15X 94\_C: 10 Sekunden, 68\_C: 1 Minute, 72\_C: 2.5 Minuten;  
 94\_C: 10 Sekunden, 68\_C: 1 Minute, 72\_C: 2.5 Minuten;  
 94\_C: 10 Sekunden, 29\_C: 1 Minute, 72\_C: 2.5 Minuten  
 1X 72\_C: 5 Minuten
- [0450] Die TAIL2-PCR erfolgte in einem 21 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:
- 1 ml einer 1:50 Verdünnung des TAIL1-Reaktionsansatzes (hergestellt wie oben beschrieben)
  - 0.8 mM dNTP
  - 0.2 mM PR61 (SEQ ID NO: 67)
  - 0.2 mM AD1 (SEQ ID NO: 69)
  - 2 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
  - 0.5 U R Taq Polymerase (TAKARA)
  - mit Aq. Dest. auf 21 ml aufgefüllt
- [0451] Die PCR-Reaktion TAIL2 wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:
- 12X 94\_C: 10 Sekunden, 64\_C: 1 Minute, 72\_C: 2.5 Minuten;  
 94\_C: 10 Sekunden, 64\_C: 1 Minute, 72\_C: 2.5 Minuten;  
 94\_C: 10 Sekunden, 29\_C: 1 Minute, 72\_C: 2.5 Minuten  
 1X 72\_C: 5 Minuten
- [0452] Die TAIL3-PCR erfolgte in einem 100 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:
- 1 ml einer 1:10 Verdünnung des TAIL2-Reaktionsansatzes (hergestellt wie oben beschrieben)
  - 0.8 mM dNTP
  - 0.2 mM PR63 (SEQ ID NO: 68)
  - 0.2 mM AD1 (SEQ ID NO: 69)
  - 10 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
  - 0.5 U R Taq Polymerase (TAKARA)
  - mit Aq. Dest. auf 100 ml aufgefüllt
- [0453] Die PCR-Reaktion TAIL3 wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:
- 20X 94\_C: 15 Sekunden, 29\_C: 30 Sekunden, 72\_C: 2 Minuten  
 1X 72\_C: 5 Minuten
- [0454] Die PCR-Amplifikation mit Primer PR63 und AD1 resultierte in einem 280 Bp-Fragment, das unter anderem das 199 by Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält (**Abb. 12**).
- [0455] Das Amplifikat, wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit den Primern M13 und T7 ergaben die Sequenz SEQ ID NO: 46. Diese Sequenz ist identisch mit der Sequenz SEQ ID NO: 45, die mit der IPCR Strategie isoliert wurde und repräsentiert somit die Nukleotidsequenz in der verwendeten Tagetes erecta Linie Orangenprinz.

[0456] Der pCR2.1-Klon, der das 312 by Fragment (SEQ ID NO: 45) des Epsilon-Cyclase Promoters, das durch die IPCR-Strategie isoliert wurde, enthält, heisst pTA-ecycP und wurde für die Herstellung der IR Konstrukte verwendet.

#### Beispiel I.14

Herstellung einer Inverted-Repeat-Expressionskassette für die blütenspezifische Expression von Epsilon-cyclase dsRNAs in *Tagetes erecta* (gerichtet gegen die Promoterregion der Epsilon-Cyclase cDNA).

[0457] Die Expression von Inverted-Repeat Transkripten bestehend aus Promoterfragmenten der Epsilon-cyclase in *Tagetes erecta* erfolgte unter Kontrolle einer modifizierten Version AP3P des blütenspezifischen Promoters AP3 aus *Arabidopsis* (siehe Beispiel I.10) oder des blütenspezifischen Promoters CHRC (Genbank accession NO: AF099501). Das Inverted-Repeat Transkript enthält jeweils ein Epsilon-Cyclase-Promoterfragment in korrekter Orientierung (Sense-Fragment) und ein sequenzidentisches Epsilon-Cyclase-Promoterfragment in entgegengesetzter Orientierung (Antisense-Fragment), die durch ein funktionelles Intron (siehe Beispiel I.10) mit einander verbunden sind.

[0458] Die Promoterfragmente wurde mittels PCR unter Verwendung von Plasmid-DNA (Klon pTAecycP, siehe Beispiel I.13) und der Primer PR124 (SEQ ID NO: 70) und PR126 (SEQ ID NO: 72) bzw. der Primer PR125 (SEQ ID NO: 71) und PR127 (SEQ ID NO: 73) hergestellt.

[0459] Die Bedingungen der PCR-Reaktionen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des PR124-PR126 DNA-Fragmentes, das das Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 ml cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR124 (SEQ ID NO: 70)
- 0.2 mM PR126 (SEQ ID NO: 72)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 uml Aq. Dest.

[0460] Die PCR zur Amplifikation des PR125-PR127 DNA-Fragmentes, das das 312bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 ml cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR125 (SEQ ID NO: 71)
- 0.2 mM PR127 (SEQ ID NO: 73)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 ml Aq. Dest.

[0461] Die PCR-Reaktionen wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94_C	2 Minuten
35X	94_C	1 Minute
	53_C	1 Minuten
	72_C	1 Minuten
1X	72_C	10 Minuten

[0462] Die PCR-Amplifikation mit Primer PR124 und PR126 resultierte in einem 358 Bp-Fragment, die PCR-Amplifikation mit Primer PR125 und PR127 resultierte in einem 361 Bp-Fragment.

[0463] Die beiden Amplifikate, das PR124-PR126 (HindIII-Sall sense) Fragment und das PR125-PR127 (EcoRI-BamHI antisense) Fragment, wurden unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit dem Primer SP6 bestätigten jeweils eine Sequenz, die abgesehen von den eingeführten Restriktionsstellen identisch ist zu SEQ ID NO: 45. Diese Klone wurden daher für die Herstellung eines Inverted-Repeat Konstrukts in dem Klonierungsvektor pJAI1 (siehe Beispiel I.10) verwendet.

[0464] Der erste Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 358 Bp PR124-PR126 HindIII-Sall Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem BamHI-EcoRI geschnittenen Vektor pJAI1. Der Klon, das Epsilon-Cyclase Promoterfragment in der sense Orientierung enthält, heisst cs43.

- Durch die Ligation wird das Sense-Fragment des Epsilon-Cyclase Promoters zwischen den AP3P Promoter und das Intron eingefügt.
- [0465] Der zweite Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 361 Bp PR125-PR127 BamHI-EcoRI Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit BamHI-EcoRI geschnittenen Vektor cs43. Der Klon, der das Epsilon-Cyclase Promoterfragment in der antisense Orientierung enthält, heisst cs44. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem Intron und dem Antisense-Fragment des Epsilon-Cyclase Promoters.
- [0466] Für die Herstellung einer Inverted-Repeat Expressionskassette unter Kontrolle des CHRC-Promoters wurde ein CHRC-Promoterfragment unter Verwendung genomischer DNA aus Petunie (nach Standardmethoden hergestellt) sowie der Primer PRCHRC3' (SEQ ID NO: 77) und PRCHRC5' (SEQ ID NO: 76) amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen des resultierenden Klon pCR2.1-CHRC mit den Primern M13 und T7 bestätigten eine zur Sequenz AF099501 identische Sequenz. Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor cs44 verwendet.
- [0467] Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1537 by SacI-HindIII Fragments aus pCR2.1-CHRC und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor cs44. Der Klon, der den Promoter CHRC anstelle des ursprünglichen Promoters AP3P enthält heisst cs45.
- [0468] Für die Herstellung einer Inverted-Repeat Expressionskassette unter Kontrolle zweier Promotoren, des CHRC-Promoter und des AP3P-Promoters, wurde der AP3P-Promoter in antisense Orientierung an den 3'Terminus des Epsilon-Cyclase antisense Fragmentes in cs45 kloniert. Das AP3P-Promoterfragments aus pJA11 wurde unter Verwendung der Primer PR128 und PR129 amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Die Sequenzierung mit den Primern M13 und T7 bestätigten eine zur Sequenz SEQ ID NO: 28 (AL132971) identische Sequenz. Dieser Klon pCR2.1-AP3PSX wurde für Herstellung einer Inverted-Repeat Expressionskassette unter Kontrolle zweier Promotoren verwendet.
- [0469] Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 771 by Sall-XhoI Fragments aus pCR2.1-AP3PSX und Ligierung in den XhoI geschnittenen Vektor cs45. Der Klon, der 3'seitig des Inverted Repeats, den Promoter AP3P in antisense Orientierung enthält heisst cs46.
- [0470] Die Herstellung der Expressionsvektoren für die Agrobacterium-vermittelte Transformation des AP3P-kontrollierten Inverted-Repeat Transkripts in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).
- [0471] Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5A17 wurde das 1685bp SacI-XhoI Fragment aus cs44 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (**Abb. 13**, Konstruktkarte). In der **Abb. 13** beinhaltet Fragment AP3P den modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment P-sense das 312 by Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in sense Orientierung, Fragment intron das Intron IV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1), und Fragment P-anti das 312 by Promoterfragment der Epsilon- Cyclase in antisense Orientierung.
- [0472] Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5C17 wurde das 2445bp SacI-XhoI Fragment aus cs45 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (**Abb. 14**, Konstruktkarte).
- [0473] In der **Abb. 14** beinhaltet Fragment CHRC den CHRC-Promoter (1537 bp), Fragment P-sense das 312 by Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in sense Orientierung, Fragment intron das Intron IV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1), und Fragment P-anti das 312 by Promoterfragment der Epsilon- Cyclase in antisense Orientierung.
- [0474] Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5CA17 wurde das 3219bp SacI-XhoI Fragment aus cs46 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (**Abb. 15**, Konstruktkarte) In der **Abb. 15** beinhaltet Fragment CHRC den CHRC-Promoter (1537 bp), Fragment P-sense das 312 by Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in sense Orientierung, Fragment intron das Intron IV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1), Fragment P-anti das 312 by Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in antisense Orientierung und das Fragment AP3P das 771 by AP3P-Promoterfragment in antisense Orientierung.

#### Beispiel I.15

##### Herstellung transgener *Tagetes* Pflanzen mit reduzierter $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität

- [0475] *Tagetes* Samen werden sterilisiert und auf Keimungsmedium (MS-Medium; Murashige and Skoog, *Physiol. Plant.* 15(1962), 473-497) pH 5,8, 2 % Saccharose) aufgelegt. Die Keimung erfolgt in einem Temperatur/Licht/Zeitintervall von 18 bis 28 °C/20 bis 200 mE/3 bis 16 Wochen, bevorzugt jedoch bei 21 °C, 20 bis 70 mE, für 4 bis 8 Wochen.
- [0476] Alle Blätter der sich bis dahin entwickelten *in vitro* Pflanzen werden geerntet und quer zur Mittelrippe geschnitten. Die dadurch entstehenden Blattexplantate mit einer Größe von 10 bis 60 mm<sup>2</sup> werden im Verlaufe der Präparation in flüssigem MS-Medium bei Raumtemperatur für maximal 2 h aufbewahrt.
- [0477] Der Agrobakterium *tumefaciens* Stamm EHA105 wurde mit dem Binärplasmid pS5A13 transformiert. Die Anzucht des transformierten *A. tumefaciens* Stammes EHA105 erfolgte über Nacht unter folgenden Bedin-

gungen: Eine Einzelkolonie wurde in YEB (0,1 % Hefeextrakt, 0,5 % Rindfleischextrakt, 0,5 % Pepton, 0,5 % Saccharose, 0,5 % Magnesiumsulfat  $\times 7 \text{ H}_2\text{O}$ ) mit 25 mg/l Kanamycin angeimpft und bei 28 °C für 16 bis 20 h angezogen. Anschließend wurde die Bakteriensuspension durch Zentrifugation bei 6000 g für 10 min geerntet und derart in flüssigem MS Medium resuspendiert, das eine  $\text{OD}_{600}$  von ca. 0,1 bis 0,8 entstand. Diese Suspension wurde für die Co-Kultivierung mit dem Blattmaterial verwendet.

[0478] Unmittelbar vor der Co-Kultivierung wird das MS-Medium, in dem die Blätter aufbewahrt worden sind, durch die Bakteriensuspension ersetzt. Die Inkubation der Blättchen in der Agrobakteriensuspension erfolgte für 30 min unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur. Anschließend werden die infizierten Explantate auf ein mit Agar (z.B. 0,8 % Plant Agar (Duchefa, NL) verfestigtes MS-Medium mit Wachstumsregulatoren, wie beispielsweise 3 mg/l Benzylaminopurin (BAP) sowie 1 mg/l Indolylessigsäure (IAA) aufgelegt. Die Orientierung der Blätter auf dem Medium ist bedeutungslos. Die Kultivierung der Explantate findet für 1 bis 8 Tage, bevorzugt aber für 6 Tage statt, dabei können folgende Bedingungen angewendet werden: Lichtintensität: 30 bis 80  $\text{mMol/m}^2 \times \text{sec}$ , Temperatur: 22 bis 24 °C, hell/dunkel Wechsel von 16/8 Stunden. Anschließend werden die co-kultivierten Explantate auf frisches MS-Medium, bevorzugt mit den gleichen Wachstumsregulatoren übertragen, wobei dieses zweite Medium zusätzlich ein Antibiotikum zur Unterdrückung des Bakterienwachstums enthält. Timentin in einer Konzentration von 200 bis 500 mg/l ist für diesen Zweck sehr geeignet. Als zweite selektive Komponente wird eine für die Selektion des Transformationserfolges eingesetzt. Phosphinothricin in einer Konzentration von 1 bis 5 mg/l selektiert sehr effizient, aber auch andere selektive Komponenten gemäß des zu verwendenden Verfahrens sind denkbar.

[0479] Nach jeweils ein bis drei Wochen erfolgt der Transfer der Explantate auf frisches Medium bis sich Sprossknospen und kleine Sprosse entwickeln, die dann auf das gleiche Basalmmedium einschließlich Timentin und PPT oder alternative Komponenten mit Wachstumsregulatoren, nämlich z.B. 0,5 mg/l Indolylbuttersäure (IBA) und 0,5 mg/l Gibberillinsäure  $\text{GA}_3$ , zur Bewurzelung übertragen werden. Bewurzelte Sprosse können ins Gewächshaus überführt werden.

[0480] Zusätzlich zu der beschriebenen Methode sind folgende vorteilhafte Modifikationen möglich:

- Bevor die Explantate mit den Bakterien infiziert werden, können sie für 1 bis 12 Tage, bevorzugt 3 bis 4, auf das oben beschriebene Medium für die Co-Kultur vorinkubiert werden. Anschließend erfolgt die Infektion, Co-Kultur und selektive Regeneration wie oben beschrieben.
- Der pH Wert für die Regeneration (normalerweise 5,8) kann auf pH 5,2 gesenkt werden. Dadurch wird die Kontrolle des Agrobakterienwachstums verbessert.
- Die Zugabe von  $\text{AgNO}_3$  (3-10 mg/l) zum Regenerationsmedium verbessert den Zustand der Kultur einschließlich der Regeneration selbst.
- Komponenten, die die Phenolbildung reduzieren und dem Fachmann bekannt sind, wie z.B. Zitronensäure, Ascorbinsäure, PVP u.v.a.m., wirken sich positiv auf die Kultur aus.
- Für das gesamte Verfahren kann auch flüssiges Kulturmedium Verwendung finden. Die Kultur kann auch auf handelsüblichen Trägern, die auf dem flüssigen Medium positioniert werden inkubiert werden.

[0481] Gemäß der oben beschriebenen Transformationsmethode wurden mit dem Expressionskonstrukt pS5A13 folgende Linien erhalten:  
CS30-1, CS30-3 und CS30-4

#### Beispiel I.16:

##### Charakterisierung der transgenen *Tagetes* Pflanzen mit reduzierter $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität

[0482] Das Blütenmaterial der transgenen *Tagetes erecta* Pflanzen aus Beispiel I.15 wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert und das Pulver (etwa 250 bis 500 mg) mit 100 % Aceton extrahiert (dreimal je 500 ml). Das Lösungsmittel wurde evaporiert und die Carotinoide in 100 ml Aceton resuspendiert.

[0483] Mittels einer C30-reverse phase-Säule konnten die individuellen Carotinoide quantifiziert werden. Die HPLC-Laufbedingungen waren nahezu identisch mit einer publizierten Methode (Frazer et al. (2000), Plant Journal 24(4): 551-558). Eine Identifizierung der Carotinoide war aufgrund der UV-VIS-Spektren möglich.

[0484] Tabelle 2 zeigt das Carotinoidprofil in *Tagetes*petalen der gemäß der vorstehend beschriebenen Beispiele hergestellten transgenen *Tagetes*- und Kontroll*Tagetes*pflanzen. Alle Carotinoidmengen sind in  $\mu\text{g/g}$  Frischgewicht angegeben, prozentuale Veränderungen gegenüber der Kontrollpflanze sind in Klammern angegeben.

[0485] Im Vergleich zur genetisch nicht veränderten Kontrollpflanze, weisen die genetisch veränderten Pflanzen mit reduzierter epsilon-Cyclase-Aktivität einen deutlich erhöhten Gehalt an Carotinoiden des "β-Carotin-Weges", wie beispielsweise β-Carotin und Zeaxanthin und einen deutlich reduzierten Gehalt an Carotinoiden des "α-Carotin-Weges", wie beispielsweise Lutein auf.

Tabelle 2

Pflanze	Lutein	b-Carotin	Zeaxanthin	Violaxanthin	Gesamt-Carotinoide
Kontrolle	260	4,8	2,7	36	304
CS 30-1	35 (-86%)	13 (+170%)	4,4 (+62%)	59 (+63%)	111 (-63%)
Kontrolle	456	6,4	6,9	58	527
CS 30-3	62 (-86%)	13 (+103%)	8,9 (+29%)	75 (+29%)	159 (-70%)
CS 30-4	68 (-85%)	9,1 (+42%)	5,7 (-17%)	61 (+5%)	144 (-73%)

## Beispiel II

## Herstellung astaxanthinhaltiger Pflanzenteile der Gattung Tagetes

[0486] Die Blütenköpfe oder die Petalen der gemäß Beispiel I.6 hergestellten astaxanthinhaltigen Pflanzen der Gattung Tagetes werden abgetrennt und getrocknet. Anschließend werden die getrocknetgetrockneten Blütenköpfe oder Petalen durch Zerkleinerung in Pulverform überführt.

## Beispiel III

## Herstellung von astaxanthinhaltigen Extrakten und weitere Aufreinigung

[0487] Getrocknete Blütenblätter oder getrocknete Blütenköpfe von Tagetes erecta, hergestellt nach Beispiel I.6 werden in einem Homogenisator mit einem Überschuß (etwa 10 Teile Lösungsmittel mit einem Teil Pflanzenmaterial) an Lösungsmittel (wie z.B. Aceton, Hexan, Methylenchlorid, Methyl-tertiär-Butyl-Ether, Tetrahydrofuran, Ethanol, Heptan, Cycloheptan oder Petrolether, aber nicht ausschließlich beschränkt auf diese) oder mit einem Lösungsmittelgemisch (wie z.B. Aceton/Hexan, Ethanol/Hexan (50:50, v/v) oder Aceton/Methanol (7:3, v/v) homogenisiert und im Dunkeln und in der Kühle unter Schütteln extrahiert. Der Rückstand kann bis zu dreimal mit dem verwendeten Lösungsmittel/Lösungsmittelgemisch re-extrahiert werden. Das gesammelte organische Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemisch wird mittels Evaporator evaporiert, bis ein eingeeengtes Konzentrat erhalten wird. Zusätzlich kann nochmals mit Hexan extrahiert werden. Das verwendete Hexan wird (wiederum im Dunkeln und in der Kühle) evaporiert.

[0488] Das solchermaßen hergestellte Konzentrat wird in Hexan gelöst und mittels Säulenchromatographie mit Silica-Material chromatografiert. Ein Teil Silicamaterial wird dazu mit 1-2 Teilen Carotinoidlösung vermischt und in eine Säule gepackt. Die Säule wird ausgiebig mit Hexan im Dunkeln und in der Kühle gewaschen. Das Eluat wird verworfen. Ketocarotinoide, besonders Astaxanthin, wird durch eine Mischung von Hexan und Ethanol (2-5% Ethanol in Hexan) eluiert, bis eine orange-rötliche Fraktion eluiert. Dieses orange-rötliche Eluat wird gesammelt, bis die Farbe sich ändert. Das orange-rötlich gefärbte Eluat enthält Astaxanthin als Gemisch aus Mono- und Diestern.

## Beispiel IV

[0489] Herstellung von extrudiertem Forellenfutter, enthaltend astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltige Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes

[0490] Die folgenden Komponenten werden in einem Doppelschneckenextruder extrudiert.

Komponenten	Einwaage f. 500 kg	
	(%)	Kg
Fischmehl	30,00	150,00
Sojavollfettbohnen	20,00	100,00

Weizenquellstärke	18,00	90,00
Vitamin-Prämix	0,80	4,00
Cholinchlorid (50%)	0,20	1,00
Weizenkleber	20,00	100,00
Sipernat 50S	3,00	15,00
Fischöl	8,00	40,00

[0491] Die pulverförmigen, prozessierten astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes, beispielsweise hergestellt nach Beispiel II, werden vor der Extrusion als Komponente zugegeben.

[0492] Die astaxanthinhaltigen Extrakte oder prozessierten Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes in flüssiger Form, beispielsweise hergestellt nach Beispiel III, werden nach der Extrusion auf das Extrudat aufgesprüht (Applikation durch PPA-Methode).

[0493] Die Astaxanthin-Wirkstoff-Dosierung liegt bei 10, 20 und 40 mg Astaxanthin pro kg Diät.

[0494] Nach Beendigung des Extrusionsprozesses wird das Extrudat getrocknet und gekühlt.

#### Beispiel V

[0495] Orale Verabreichung astaxanthinhaltiger Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes an Forellen in einem Forellenstandardfutter- Prüfung der Biovertügbareit.

[0496] Das Forellenfutter, enthaltend die erfindungsgemäßen Astaxanthinpigmentierstoffe, wird gemäß Beispiel IV hergestellt und an Forellen (durchschnittliche Lebendmasse von 180 g) oral verabreicht. Es werden 3 Konzentrationen getestet: 10, 20 und 40 mg Astaxanthin aus der erfindungsgemäßen Astaxanthinpigmentierung pro kg Diät.

[0497] Die Haltung der Forellen erfolgt wie nachstehend beschrieben:

- Die Forellen erhalten standardmäßig eine Adaptationsphase von 14 Tagen.
- Während des Fütterungsversuches werden 10 Forellen pro Becken in 80 l Wasser fassenden Durchfluß-Kunststofftanks gehalten. Die Wassertemperatur liegt bei 15°C. Das Wasser wird biologisch gereinigt und es werden täglich mindestens 10% der Gesamtwassermenge durch Frischwasser ersetzt.
- Die Beleuchtungsdauer liegt bei 12 Stunden pro Tag, um eine vorzeitige Geschlechtsreife der Tier zu vermeiden.
- Die Anzahl Becken pro Behandlung liegt bei 3. Dies ist äquivalent zu 30 Forellen pro Dosisstufe.
- Aufbewahrung der Diäten erfolgt bei -20°C, um Astaxanthinverluste zu vermeiden. Das Futter wird portionsweise (wochenweise) aufgetaut und verabreicht.
- Die Versuchsdauer beträgt 8 Wochen.

[0498] Die Fütterung der Forellen erfolgt wie nachstehend beschrieben:

- Bei den verabreichten Versuchsdieten handelt es sich um das gemäß Beispiel IV hergestellte extrudierte Forellenfutter, das zusätzlich noch öl-gecoated wird.
- Während der Adaptationsphase wird extrudiertes mit Öl gecoatetes astaxanthin-freies Forellenstandardfutter gemäß Beispiel IV ohne Astaxanthin verabreicht.
- Als Negativkontrolle wird extrudiertes mit Öl gecoatetes astaxanthin-freies Forellenstandardfutter gemäß Beispiel IV ohne Astaxanthin während des gesamten Versuchszeitraumes verabreicht.
- Die Fütterung erfolgt 2x täglich von Hand bis zur Sättigung der Tiere.

[0499] Untersucht wird der Einfluß der erfindungsgemäßen Astaxanthinpigmentierung sowohl auf Leistungsparameter der Fische, wie Futteraufnahme, Futterverwertung und Lebendmassezuwachs als auch auf die Bioeffizienz der Pigmentierung.

[0500] Statisch ausgewertet werden durchschnittlicher Futterverbrauch pro Fisch, Futteraufwand und Lebendmassezuwachs.

[0501] Die Pigmentierung der Fische wird durch remissionspektrophotometrische Messungen (Minolta-a-Wert = Rotwert am Filetanschnitt) und durch Bestimmung des Astaxanthingehalts (mg/kg) im Filet jeweils im Vergleich zur Negativkontrolle gemessen.



[0502] Die Minoltawerte a-Werte, welche den Rotanteil des Farbtöns repräsentieren, nehmen mit kleiner werdender Steigung der Funktion dosisabhängig zu. Die Minolta b- Werte, die den Gelbanteil widerspiegeln liegen im negativen Bereich oder bewegen sich um Null. Dies bedeutet der Rotton der Forellenfilets weist eine Abhängigkeit zu der aufgenommenen Astaxanthinmenge auf.

[0503] Während des Versuches werden für die beobachteten Leistungsparameter sowohl zwischen als auch innerhalb der Behandlungen (Astaxanthinhaltiges Pulver, astaxanthinhaltiger Extrakt in flüssiger Form, synthetisches Astaxanthin, Negativkontrolle) keine statistisch gerichteten Unterschiede beobachtet.

[0504] Es zeigt sich, dass astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltige Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes bei der Pigmentierung von Forellen als Vertreter der Salmoniden bioverfügbar sind und zudem zu keinen adversen Effekten auf die biologische Leistung der Forelle führen.



55	60	65	
aca atg gcg cta cgt gtc atc ggc tcc tgg gcc gca gtg ttc ctc cac Thr Met Ala Leu Arg Val Ile Gly Ser Trp Ala Ala Val Phe Leu His 70 75 80			417
gcc att ttt caa atc aag ctt ccg acc tcc ttg gac cag ctg cac tgg Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu Asp Gln Leu His Trp 85 90 95 100			465
ctg ccc gtg tca gat gcc aca gct cag ctg gtt agc ggc acg agc agc Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val Ser Gly Thr Ser Ser 105 110 115			513
ctg ctc gac atc gtc gta gta ttc ttt gtc ctg gag ttc ctg tac aca Leu Leu Asp Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu Glu Phe Leu Tyr Thr 120 125 130			561
ggc ctt ttt atc acc acg cat gat gct atg cat ggc acc atc gcc atg Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His Gly Thr Ile Ala Met 135 140 145			609
aga aac agg cag ctt aat gac ttc ttg ggc aga gta tgc atc tcc ttg Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg Val Cys Ile Ser Leu 150 155 160			657
tac gcc tgg ttt gat tac aac atg ctg cac cgc aag cat tgg gag cac Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg Lys His Trp Glu His 165 170 175 180			705
cac aac cac act ggc gag gtg ggc aag gac cct gac ttc cac agg gga His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp Phe His Arg Gly 185 190 195			753
aac cct ggc att gtg ccc tgg ttt gcc agc ttc atg tcc agc tac atg Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met Ser Ser Tyr Met 200 205 210			801
tcg atg tgg cag ttt gcg cgc ctc gca tgg tgg acg gtg gtc atg cag Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp Thr Val Val Met Gln 215 220 225			849
ctg ctg ggt gcg cca atg gcg aac ctg ctg gtg ttc atg gcg gcc gcg Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val Phe Met Ala Ala Ala 230 235 240			897
ccc atc ctg tcc gcc ttc cgc ttg ttc tac ttt ggc acg tac atg ccc Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Tyr Met Pro 245 250 255 260			945
cac aag cct gag cct ggc gcc gcg tca ggc tct tca cca gcc gtc atg His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser Ser Pro Ala Val Met 265 270 275			993
aac tgg tgg aag tcg cgc act agc cag gcg tcc gac ctg gtc agc ttt Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser Asp Leu Val Ser Phe 280 285 290			1041
ctg acc tgc tac cac ttc gac ctg cac tgg gag cac cac cgc tgg ccc Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu His His Arg Trp Pro 295 300 305			1089
ttc gcc ccc tgg tgg gag ctg ccc aac tgc cgc cgc ctg tct ggc cga Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg Leu Ser Gly Arg 310 315 320			1137
ggt ctg gtt cct gcc tag ctggacacac tgcagtgggc cctgctgcca Gly Leu Val Pro Ala			1185

325

```

gctgggcatg caggttgtgg caggactggg tgaggtgaaa agctgcaggc gctgctgccg 1245
gacacgctgc atgggctacc ctgtgtagct gccgccacta ggggaggggg tttgtagctg 1305
tcgagcttgc cccatggatg aagctgtgta gtggtgcagg gactacaccc acaggccaac 1365
acccttgacg gagatgtctt gcgtcgggag gagtggtggg cagtgtagat gctatgattg 1425
tatcttaatg ctgaagcctt taggggagcg acacttagtg ctgggcaggc aacgccctgc 1485
aaggtgcagg cacaagctag gctggacgag gactcgggtg caggcagggtg aagaggtgcg 1545
ggagggtggt gccacaccca ctgggcaaga ccatgctgca atgctggcgg tgtggcagtg 1605
agagctgcgt gattaactgg gctatggatt gtttgagcag tctcattat tctttgatat 1665
agatactggt caggcagggtc aggagagtga gtatgaacaa gttgagaggt ggtgcgctgc 1725
ccctgcgctt atgaagctgt aacaataaag tggttcaaaa aaaaaa 1771

```

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 329

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Haematococcus pluvialis

&lt;400&gt; 2

```

Met Gln Leu Ala Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala
1           5           10           15

```

```

Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp Val
20           25           30

```

```

Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser Asp
35           40           45

```

```

Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser Asp
50           55           60

```

```

Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Arg Val Ile Gly Ser Trp Ala Ala
65           70           75           80

```

```

Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu Asp
85           90           95

```

```

Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val Ser
100          105          110

```

```

Gly Thr Ser Ser Leu Leu Asp Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu Glu
115          120          125

```

```

Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His Gly

```

## Fischfutter.ST25.txt

130

135

140

Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg Val  
 145 150 155 160

Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg Lys  
 165 170 175

His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp  
 180 185 190

Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met  
 195 200 205

Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp Thr  
 210 215 220

Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val Phe  
 225 230 235 240

Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly  
 245 250 255

Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser Ser  
 260 265 270

Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser Asp  
 275 280 285

Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu His  
 290 295 300

His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg  
 305 310 315 320

Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala  
 325

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 1662

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Haematococcus pluvialis

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (168)..(1130)

&lt;223&gt;

## Fischfutter.ST25.txt

```

<400> 3
cggggcaact caagaaattc aacagctgca agcgcgcccc agcctcacag cgccaagtga      60
gctatcgacg tggttgtgag cgctcgacgt ggtccactga cgggcctgtg agcctctgcg      120
ctccgtcctc tgccaaatct cgcgtcgggg cctgcctaag tcgaaga atg cac gtc      176
                                     Met His Val
                                     1

gca tcg gca cta atg gtc gag cag aaa ggc agt gag gca gct gct tcc      224
Ala Ser Ala Leu Met Val Glu Gln Lys Gly Ser Glu Ala Ala Ala Ser
5                                     10                                     15

agc cca gac gtc ttg aga gcg tgg gcg aca cag tat cac atg cca tcc      272
Ser Pro Asp Val Leu Arg Ala Trp Ala Thr Gln Tyr His Met Pro Ser
20                                     25                                     30                                     35

gag tcg tca gac gca gct cgt cct gcg cta aag cac gcc tac aaa cct      320
Glu Ser Ser Asp Ala Ala Arg Pro Ala Leu Lys His Ala Tyr Lys Pro
40                                     45                                     50

cca gca tct gac gcc aag ggc atc acg atg gcg ctg acc atc att ggc      368
Pro Ala Ser Asp Ala Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Thr Ile Ile Gly
55                                     60                                     65

acc tgg acc gca gtg ttt tta cac gca ata ttt caa atc agg cta ccg      416
Thr Trp Thr Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Arg Leu Pro
70                                     75                                     80

aca tcc atg gac cag ctt cac tgg ttg cct gtg tcc gaa gcc aca gcc      464
Thr Ser Met Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Glu Ala Thr Ala
85                                     90                                     95

cag ctt ttg ggc gga agc agc agc cta ctg cac atc gct gca gtc ttc      512
Gln Leu Leu Gly Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Ala Ala Val Phe
100                                     105                                     110                                     115

att gta ctt gag ttc ctg tac act ggt cta ttc atc acc aca cat gac      560
Ile Val Leu Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp
120                                     125                                     130

gca atg cat ggc acc ata gct ttg agg cac agg cag ctc aat gat ctc      608
Ala Met His Gly Thr Ile Ala Leu Arg His Arg Gln Leu Asn Asp Leu
135                                     140                                     145

ctt ggc aac atc tgc ata tca ctg tac gcc tgg ttt gac tac agc atg      656
Leu Gly Asn Ile Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Ser Met
150                                     155                                     160

ctg cat cgc aag cac tgg gag cac cac aac cat act ggc gaa gtg ggg      704
Leu His Arg Lys His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly
165                                     170                                     175

aaa gac cct gac ttc cac aag gga aat ccc ggc ctt gtc ccc tgg ttc      752
Lys Asp Pro Asp Phe His Lys Gly Asn Pro Gly Leu Val Pro Trp Phe
180                                     185                                     190                                     195

gcc agc ttc atg tcc agc tac atg tcc ctg tgg cag ttt gcc cgg ctg      800
Ala Ser Phe Met Ser Ser Tyr Met Ser Leu Trp Gln Phe Ala Arg Leu
200                                     205                                     210

gca tgg tgg gca gtg gtg atg caa atg ctg ggg gcg ccc atg gca aat      848
Ala Trp Trp Ala Val Val Met Gln Met Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn
215                                     220                                     225

```

## Fischfutter.ST25.txt

ctc cta gtc ttc atg gct gca gcc cca atc ttg tca gca ttc cgc ctc	896
Leu Leu Val Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu	
230 235 240	
ttc tac ttc ggc act tac ctg cca cac aag cct gag cca ggc cct gca	944
Phe Tyr Phe Gly Thr Tyr Leu Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Pro Ala	
245 250 255	
gca ggc tct cag gtg atg gcc tgg ttc agg gcc aag aca agt gag gca	992
Ala Gly Ser Gln Val Met Ala Trp Phe Arg Ala Lys Thr Ser Glu Ala	
260 265 270 275	
tct gat gtg atg agt ttc ctg aca tgc tac cac ttt gac ctg cac tgg	1040
Ser Asp Val Met Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp	
280 285 290	
gag cac cac agg tgg ccc ttt gcc ccc tgg tgg cag ctg ccc cac tgc	1088
Glu His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Gln Leu Pro His Cys	
295 300 305	
cgc cgc ctg tcc ggg cgt ggc ctg gtg cct gcc ttg gca tga	1130
Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala Leu Ala	
310 315 320	
cctgggtccct ccgctggtga cccagcgtct gcacaagagt gtcattgtac aggggtgctgc	1190
ggccagtggc agcgagtgct actctcagcc tgtatggggc taccgctgtg ccactgagca	1250
ctgggcatgc cactgagcac tgggctgtct actgagcaat gggcgtgcta ctgagcaatg	1310
ggcgtgctac tgacaatggg cgtgctactg gggctctggca gtggctagga tggagtttga	1370
tgcattcagt agcgggtggcc aacgtcatgt ggatggtgga agtgctgagg ggtttaggca	1430
gccggcattt gagaggggcta agttataaat cgcatgctgc tcatgcgcac atatctgcac	1490
acagccaggg aaatcccttc gagagtgatt atgggacact tgtattgggt tcgtgctatt	1550
gttttattca gcagcagtac ttagtgaggg tgagagcagg gtggtgagag tggagtgagt	1610
gagtatgaac ctggtcagcg aggtgaacag cctgtaatga atgactctgt ct	1662

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 320

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Haematococcus pluvialis

&lt;400&gt; 4

Met His Val Ala Ser Ala Leu Met Val Glu Gln Lys Gly Ser Glu Ala
1 5 10 15

Ala Ala Ser Ser Pro Asp Val Leu Arg Ala Trp Ala Thr Gln Tyr His
20 25 30

Met Pro Ser Glu Ser Ser Asp Ala Ala Arg Pro Ala Leu Lys His Ala
35 40 45

Tyr Lys Pro Pro Ala Ser Asp Ala Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Thr

## Fischfutter.ST25.txt

50

55

60

Ile Ile Gly Thr Trp Thr Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile  
 65 70 75 80  
 Arg Leu Pro Thr Ser Met Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Glu  
 85 90 95  
 Ala Thr Ala Gln Leu Leu Gly Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Ala  
 100 105 110  
 Ala Val Phe Ile Val Leu Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr  
 115 120 125  
 Thr His Asp Ala Met His Gly Thr Ile Ala Leu Arg His Arg Gln Leu  
 130 135 140  
 Asn Asp Leu Leu Gly Asn Ile Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp  
 145 150 155 160  
 Tyr Ser Met Leu His Arg Lys His Trp Glu His His Asn His Thr Gly  
 165 170 175  
 Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp Phe His Lys Gly Asn Pro Gly Leu Val  
 180 185 190  
 Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met Ser Ser Tyr Met Ser Leu Trp Gln Phe  
 195 200 205  
 Ala Arg Leu Ala Trp Trp Ala Val Val Met Gln Met Leu Gly Ala Pro  
 210 215 220  
 Met Ala Asn Leu Leu Val Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala  
 225 230 235 240  
 Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Tyr Leu Pro His Lys Pro Glu Pro  
 245 250 255  
 Gly Pro Ala Ala Gly Ser Gln Val Met Ala Trp Phe Arg Ala Lys Thr  
 260 265 270  
 Ser Glu Ala Ser Asp Val Met Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp  
 275 280 285  
 Leu His Trp Glu His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Gln Leu  
 290 295 300  
 Pro His Cys Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala Leu Ala  
 305 310 315 320

&lt;210&gt; 5



## Fischfutter.ST25.txt

&lt;211&gt; 729

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Agrobacterium aurantiacum

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(729)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 5

atg agc gca cat gcc ctg ccc aag gca gat ctg acc gcc acc agc ctg	48
Met Ser Ala His Ala Leu Pro Lys Ala Asp Leu Thr Ala Thr Ser Leu	
1 5 10 15	
atc gtc tcg ggc ggc atc atc gcc gct tgg ctg gcc ctg cat gtg cat	96
Ile Val Ser Gly Gly Ile Ile Ala Ala Trp Leu Ala Leu His Val His	
20 25 30	
gcg ctg tgg ttt ctg gac gca gcg gcg cat ccc atc ctg gcg atc gca	144
Ala Leu Trp Phe Leu Asp Ala Ala Ala His Pro Ile Leu Ala Ile Ala	
35 40 45	
aat ttc ctg ggg ctg acc tgg ctg tcg gtc gga ttg ttc atc atc gcg	192
Asn Phe Leu Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala	
50 55 60	
cat gac gcg atg cac ggg tcg gtg gtg ccg ggg cgt ccg cgc gcc aat	240
His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn	
65 70 75 80	
gcg gcg atg ggc cag ctt gtc ctg tgg ctg tat gcc gga ttt tcg tgg	288
Ala Ala Met Gly Gln Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp	
85 90 95	
cgc aag atg atc gtc aag cac atg gcc cat cac cgc cat gcc gga acc	336
Arg Lys Met Ile Val Lys His Met Ala His His Arg His Ala Gly Thr	
100 105 110	
gac gac gac ccc gat ttc gac cat ggc ggc ccg gtc cgc tgg tac gcc	384
Asp Asp Asp Pro Asp Phe Asp His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Ala	
115 120 125	
cgc ttc atc ggc acc tat ttc ggc tgg cgc gag ggg ctg ctg ctg ccc	432
Arg Phe Ile Gly Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro	
130 135 140	
gtc atc gtg acg gtc tat gcg ctg atc ctt ggc gat cgc tgg atg tac	480
Val Ile Val Thr Val Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr	
145 150 155 160	
gtg gtc ttc tgg ccg ctg ccg tcg atc ctg gcg tcg atc cag ctg ttc	528
Val Val Phe Trp Pro Leu Pro Ser Ile Leu Ala Ser Ile Gln Leu Phe	
165 170 175	
gtg ttc ggc acc tgg ctg ccg cac cgc ccc ggc cac gac gcg ttc ccg	576
Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Ala Phe Pro	
180 185 190	

Fischfutter.ST25.txt

gac	cgc	cac	aat	gcg	cgg	tcg	tcg	cgg	atc	agc	gac	ccc	gtg	tcg	ctg	624
Asp	Arg	His	Asn	Ala	Arg	Ser	Ser	Arg	Ile	Ser	Asp	Pro	Val	Ser	Leu	
		195					200					205				
ctg	acc	tgc	ttt	cac	ttt	ggc	ggt	tat	cat	cac	gaa	cac	cac	ctg	cac	672
Leu	Thr	Cys	Phe	His	Phe	Gly	Gly	Tyr	His	His	Glu	His	His	Leu	His	
	210					215					220					
ccg	acg	gtg	ccg	tgg	tgg	cgc	ctg	ccc	agc	acc	cgc	acc	aag	ggg	gac	720
Pro	Thr	Val	Pro	Trp	Trp	Arg	Leu	Pro	Ser	Thr	Arg	Thr	Lys	Gly	Asp	
	225				230					235					240	
acc	gca	tga														729
Thr	Ala															

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 242

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Agrobacterium aurantiacum

&lt;400&gt; 6

Met	Ser	Ala	His	Ala	Leu	Pro	Lys	Ala	Asp	Leu	Thr	Ala	Thr	Ser	Leu	
1				5					10					15		
Ile	Val	Ser	Gly	Gly	Ile	Ile	Ala	Ala	Trp	Leu	Ala	Leu	His	Val	His	
			20					25					30			
Ala	Leu	Trp	Phe	Leu	Asp	Ala	Ala	Ala	His	Pro	Ile	Leu	Ala	Ile	Ala	
		35					40					45				
Asn	Phe	Leu	Gly	Leu	Thr	Trp	Leu	Ser	Val	Gly	Leu	Phe	Ile	Ile	Ala	
	50					55					60					
His	Asp	Ala	Met	His	Gly	Ser	Val	Val	Pro	Gly	Arg	Pro	Arg	Ala	Asn	
	65				70					75					80	
Ala	Ala	Met	Gly	Gln	Leu	Val	Leu	Trp	Leu	Tyr	Ala	Gly	Phe	Ser	Trp	
			85					90						95		
Arg	Lys	Met	Ile	Val	Lys	His	Met	Ala	His	His	Arg	His	Ala	Gly	Thr	
			100					105					110			
Asp	Asp	Asp	Pro	Asp	Phe	Asp	His	Gly	Gly	Pro	Val	Arg	Trp	Tyr	Ala	
		115					120					125				
Arg	Phe	Ile	Gly	Thr	Tyr	Phe	Gly	Trp	Arg	Glu	Gly	Leu	Leu	Leu	Pro	
	130					135					140					
Val	Ile	Val	Thr	Val	Tyr	Ala	Leu	Ile	Leu	Gly	Asp	Arg	Trp	Met	Tyr	
	145				150					155					160	

## Fischfutter.ST25.txt

Val Val Phe Trp Pro Leu Pro Ser Ile Leu Ala Ser Ile Gln Leu Phe  
 165 170 175

Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Ala Phe Pro  
 180 185 190

Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Ser Arg Ile Ser Asp Pro Val Ser Leu  
 195 200 205

Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His  
 210 215 220

Pro Thr Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Ser Thr Arg Thr Lys Gly Asp  
 225 230 235 240

Thr Ala

<210> 7

<211> 1631

<212> DNA

<213> Alcaligenes sp.

<220>

<221> CDS

<222> (99)..(827)

<223>

<400> 7

ctgcaggccg ggcccgggtgg ccaatgggtcg caaccggcag gactggaaca ggacggcggg 60

ccgggtctagg ctgtcgccct acgcagcagg agtttcgg atg tcc gga cgg aag cct 116  
 Met Ser Gly Arg Lys Pro  
 1 5

ggc aca act ggc gac acg atc gtc aat ctc ggt ctg acc gcc gcg atc 164  
 Gly Thr Thr Gly Asp Thr Ile Val Asn Leu Gly Leu Thr Ala Ala Ile  
 10 15 20

ctg ctg tgc tgg ctg gtc ctg cac gcc ttt acg cta tgg ttg cta gat 212  
 Leu Leu Cys Trp Leu Val Leu His Ala Phe Thr Leu Trp Leu Leu Asp  
 25 30 35

gcg gcc gcg cat ccg ctg ctt gcc gtg ctg tgc ctg gct ggg ctg acc 260  
 Ala Ala Ala His Pro Leu Leu Ala Val Leu Cys Ala Gly Leu Thr  
 40 45 50

tgg ctg tgc gtc ggg ctg ttc atc atc gcg cat gac gca atg cac ggg 308  
 Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala His Asp Ala Met His Gly  
 55 60 65 70

## Fischfutter.ST25.txt

tcc gtg gtg ccg ggg cgg ccg cgc gcc aat gcg gcg atc ggg caa ctg Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn Ala Ala Ile Gly Gln Leu 75 80 85	356
gcg ctg tgg ctc tat gcg ggg ttc tgc tgg ccc aag ctg atc gcc aag Ala Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp Pro Lys Leu Ile Ala Lys 90 95 100	404
cac atg acg cat cac cgg cac gcc ggc acc gac aac gat ccc gat ttc His Met Thr His His Arg His Ala Gly Thr Asp Asn Asp Pro Asp Phe 105 110 115	452
ggt cac gga ggg ccc gtg cgc tgg tac ggc agc ttc gtc tcc acc tat Gly His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Gly Ser Phe Val Ser Thr Tyr 120 125 130	500
ttc ggc tgg cga gag gga ctg ctg cta ccg gtc atc gtc acc acc tat Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro Val Ile Val Thr Thr Tyr 135 140 145 150	548
gcg ctg atc ctg ggc gat cgc tgg atg tat gtc atc ttc tgg ccg gtc Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr Val Ile Phe Trp Pro Val 155 160 165	596
ccg gcc gtt ctg gcg tgc atc cag att ttc gtc ttc gga act tgg ctg Pro Ala Val Leu Ala Ser Ile Gln Ile Phe Val Phe Gly Thr Trp Leu 170 175 180	644
ccc cac cgc ccg gga cat gac gat ttt ccc gac cgg cac aac gcg agg Pro His Arg Pro Gly His Asp Asp Phe Pro Asp Arg His Asn Ala Arg 185 190 195	692
tgc acc ggc atc ggc gac ccg ttg tca cta ctg acc tgc ttc cat ttc Ser Thr Gly Ile Gly Asp Pro Leu Ser Leu Leu Thr Cys Phe His Phe 200 205 210	740
ggc ggc tat cac cac gaa cat cac ctg cat ccg cat gtc ccg tgg tgg Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His Pro His Val Pro Trp Trp 215 220 225 230	788
cgc ctg cct cgt aca cgc aag acc gga ggc cgc gca tga cgcaattcct Arg Leu Pro Arg Thr Arg Lys Thr Gly Gly Arg Ala 235 240	837
cattgtcgtg gcgacagtcc tcgtgatgga gctgaccgcc tattccgtcc accgctggat	897
tatgcacggc cccctaggct ggggctggca caagtcccat cacgaagagc acgaccacgc	957
gttgaggagaag aacgacctct acggcgtcgt cttcgcggtg ctggcgacga tcctcttcac	1017
cgtgggcgcc tattggtggc cgggtgctgtg gtggatcgcc ctgggcatga cggcttatgg	1077
gttgatctat ttcacctgc acgacgggct tgtgcatcaa cgctggccgt ttcggtatat	1137
tccgcggcgg ggctatttcc gcaggctcta ccaagctcat cgctgcacc acgcggtcga	1197
ggggcgggac cactgcgtca gcttcggctt catctatgcc ccacccgtgg acaagctgaa	1257
gcaggatctg aagcggtcgg gtgtcctgcg cccccaggac gagcgtccgt cgtgatctct	1317
gatcccgcg tggccgatg aaatccgacg tgctgctggc aggggcccggc cttgccaacg	1377
gactgatcgc gctggcgatc cgcaaggcgc ggcccacct tcgcgtgctg ctgctggacc	1437
gtgcggcggg cgcctcggac gggcatactt ggtcctgcca cgacaccgat ttggcgccgc	1497
actggctgga ccgcctgaag ccgatcaggc gtggcgactg gcccgatcag gaggtgcggt	1557

Fischfutter.ST25.txt

tcccagacca ttcgcgaagg ctccgggccg gatatggctc gatcgacggg cgggggctga 1617  
 tgcgtgctgt gacc 1631

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 242

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Alcaligenes sp.

&lt;400&gt; 8

Met Ser Gly Arg Lys Pro Gly Thr Thr Gly Asp Thr Ile Val Asn Leu  
 1 5 10 15

Gly Leu Thr Ala Ala Ile Leu Leu Cys Trp Leu Val Leu His Ala Phe  
 20 25 30

Thr Leu Trp Leu Leu Asp Ala Ala Ala His Pro Leu Leu Ala Val Leu  
 35 40 45

Cys Leu Ala Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala  
 50 55 60

His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn  
 65 70 75 80

Ala Ala Ile Gly Gln Leu Ala Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp  
 85 90 95

Pro Lys Leu Ile Ala Lys His Met Thr His His Arg His Ala Gly Thr  
 100 105 110

Asp Asn Asp Pro Asp Phe Gly His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Gly  
 115 120 125

Ser Phe Val Ser Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro  
 130 135 140

Val Ile Val Thr Thr Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr  
 145 150 155 160

Val Ile Phe Trp Pro Val Pro Ala Val Leu Ala Ser Ile Gln Ile Phe  
 165 170 175

Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Asp Phe Pro  
 180 185 190

Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Thr Gly Ile Gly Asp Pro Leu Ser Leu  
 195 200 205

## Fischfutter.ST25.txt

Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His  
 210 215 220

Pro His Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Arg Thr Arg Lys Thr Gly Gly  
 225 230 235 240

Arg Ala

<210> 9

<211> 729

<212> DNA

<213> *Paracoccus marcusii*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(729)

<223>

<400> 9  
 atg agc gca cat gcc ctg ccc aag gca gat ctg acc gcc aca agc ctg 48  
 Met Ser Ala His Ala Leu Pro Lys Ala Asp Leu Thr Ala Thr Ser Leu  
 1 5 10  
 atc gtc tcg ggc ggc atc atc gcc gca tgg ctg gcc ctg cat gtg cat 96  
 Ile Val Ser Gly Gly Ile Ile Ala Ala Trp Leu Ala Leu His Val His  
 20 25 30  
 gcg ctg tgg ttt ctg gac gcg gcg gcc cat ccc atc ctg gcg gtc gcg 144  
 Ala Leu Trp Phe Leu Asp Ala Ala Ala His Pro Ile Leu Ala Val Ala  
 35 40 45  
 aat ttc ctg ggg ctg acc tgg ctg tcg gtc gga ttg ttc atc atc gcg 192  
 Asn Phe Leu Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala  
 50 55 60  
 cat gac gcg atg cac ggg tcg gtc gtg ccg ggg cgt ccg cgc gcc aat 240  
 His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn  
 65 70 75 80  
 gcg gcg atg ggc cag ctt gtc ctg tgg ctg tat gcc gga ttt tcg tgg 288  
 Ala Ala Met Gly Gln Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp  
 85 90 95  
 cgc aag atg atc gtc aag cac atg gcc cat cac cgc cat gcc gga acc 336  
 Arg Lys Met Ile Val Lys His Met Ala His His Arg His Ala Gly Thr  
 100 105 110  
 gac gac gac cca gat ttc gac cat ggc ggc ccg gtc cgc tgg tac gcc 384  
 Asp Asp Asp Pro Asp Phe Asp His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Ala  
 115 120 125  
 cgc ttc atc ggc acc tat ttc ggc tgg cgc gag ggg ctg ctg ctg ccc 432  
 Arg Phe Ile Gly Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro

## Fischfutter.ST25.txt

130	135	140	
gtc atc gtg acg gtc tat gcg ctg atc ctg ggg gat cgc tgg atg tac Val Ile Val Thr Val Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr 145 150 155 160			480
gtg gtc ttc tgg ccg ttg ccg tcg atc ctg gcg tcg atc cag ctg ttc Val Val Phe Trp Pro Leu Pro Ser Ile Leu Ala Ser Ile Gln Leu Phe 165 170 175			528
gtg ttc ggc act tgg ctg ccg cac cgc ccc ggc cac gac gcg ttc ccg Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Ala Phe Pro 180 185 190			576
gac cgc cat aat gcg cgg tcg tcg cgg atc agc gac cct gtg tcg ctg Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Ser Arg Ile Ser Asp Pro Val Ser Leu 195 200 205			624
ctg acc tgc ttt cat ttt ggc ggt tat cat cac gaa cac cac ctg cac Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His 210 215 220			672
ccg acg gtg ccg tgg tgg cgc ctg ccc agc acc cgc acc aag ggg gac Pro Thr Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Ser Thr Arg Thr Lys Gly Asp 225 230 235 240			720
acc gca tga Thr Ala			729

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 242

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Paracoccus marcusii

&lt;400&gt; 10

Met Ser Ala His Ala Leu Pro Lys Ala Asp Leu Thr Ala Thr Ser Leu  
1 5 10 15

Ile Val Ser Gly Gly Ile Ile Ala Ala Trp Leu Ala Leu His Val His  
20 25 30

Ala Leu Trp Phe Leu Asp Ala Ala Ala His Pro Ile Leu Ala Val Ala  
35 40 45

Asn Phe Leu Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala  
50 55 60

His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn  
65 70 75 80

Ala Ala Met Gly Gln Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp  
85 90 95

Arg Lys Met Ile Val Lys His Met Ala His His Arg His Ala Gly Thr

## Fischfutter.ST25.txt

100

105

110

Asp Asp Asp Pro Asp Phe Asp His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Ala  
 115 120 125

Arg Phe Ile Gly Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro  
 130 135 140

Val Ile Val Thr Val Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr  
 145 150 155 160

Val Val Phe Trp Pro Leu Pro Ser Ile Leu Ala Ser Ile Gln Leu Phe  
 165 170 175

Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Ala Phe Pro  
 180 185 190

Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Ser Arg Ile Ser Asp Pro Val Ser Leu  
 195 200 205

Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His  
 210 215 220

Pro Thr Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Ser Thr Arg Thr Lys Gly Asp  
 225 230 235 240

Thr Ala

<210> 11

<211> 1629

<212> DNA

<213> Synechococcus sp.

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1629)

<223>

<400> 11

atg atc acc acc gat gtt gtc att att ggg gcg ggg cac aat ggc tta  
 Met Ile Thr Thr Asp Val Val Ile Ile Gly Ala Gly His Asn Gly Leu  
 1 5 10 15

48

gtc tgt gca gcc tat ttg ctc caa cgg ggc ttg ggg gtg acg tta cta  
 Val Cys Ala Ala Tyr Leu Leu Gln Arg Gly Leu Gly Val Thr Leu Leu  
 20 25 30

96



Fischfutter.ST25.txt																	
gaa aag cgg gaa gta cca ggg ggg gcg gcc acc aca gaa gct ctc atg	Glu Lys Arg Glu Val Pro Gly Gly Ala Ala Thr Thr Glu Ala Leu Met	35	40	45													144
ccg gag cta tcc ccc cag ttt cgc ttt aac cgc tgt gcc att gac cac	Pro Glu Leu Ser Pro Gln Phe Arg Phe Asn Arg Cys Ala Ile Asp His	50	55	60													192
gaa ttt atc ttt ctg ggg ccg gtg ttg cag gag cta aat tta gcc cag	Glu Phe Ile Phe Leu Gly Pro Val Leu Gln Glu Leu Asn Leu Ala Gln	65	70	75	80												240
tat ggt ttg gaa tat tta ttt tgt gac ccc agt gtt ttt tgt ccg ggg	Tyr Gly Leu Glu Tyr Leu Phe Cys Asp Pro Ser Val Phe Cys Pro Gly	85		90	95												288
ctg gat ggc caa gct ttt atg agc tac cgt tcc cta gaa aaa acc tgt	Leu Asp Gly Gln Ala Phe Met Ser Tyr Arg Ser Leu Glu Lys Thr Cys	100		105	110												336
gcc cac att gcc acc tat agc ccc cga gat gcg gaa aaa tat cgg caa	Ala His Ile Ala Thr Tyr Ser Pro Arg Asp Ala Glu Lys Tyr Arg Gln	115		120	125												384
ttt gtc aat tat tgg acg gat ttg ctc aac gct gtc cag cct gct ttt	Phe Val Asn Tyr Trp Thr Asp Leu Leu Asn Ala Val Gln Pro Ala Phe	130	135	140													432
aat gct ccg ccc cag gct tta cta gat tta gcc ctg aac tat ggt tgg	Asn Ala Pro Pro Gln Leu Leu Asp Leu Ala Leu Asn Tyr Gly Trp	145	150	155	160												480
gaa aac tta aaa tcc gtg ctg gcg atc gcc ggg tcg aaa acc aag gcg	Glu Asn Leu Lys Ser Val Leu Ala Ile Ala Gly Ser Lys Thr Lys Ala	165	170	175													528
ttg gat ttt atc cgc act atg atc ggc tcc ccg gaa gat gtg ctc aat	Leu Asp Phe Ile Arg Thr Met Ile Gly Ser Pro Glu Asp Val Leu Asn	180	185	190													576
gaa tgg ttc gac agc gaa cgg gtt aaa gct cct tta gct aga cta tgt	Glu Trp Phe Asp Ser Glu Arg Val Lys Ala Pro Leu Ala Arg Leu Cys	195	200	205													624
tcg gaa att ggc gct ccc cca tcc caa aag ggt agt agc tcc ggc atg	Ser Glu Ile Gly Ala Pro Pro Ser Gln Lys Gly Ser Ser Ser Gly Met	210	215	220													672
atg atg gtg gcc atg cgg cat ttg gag gga att gcc aga cca aaa gga	Met Met Val Ala Met Arg His Leu Glu Gly Ile Ala Arg Pro Lys Gly	225	230	235	240												720
ggc act gga gcc ctc aca gaa gcc ttg gtg aag tta gtg caa gcc caa	Gly Thr Gly Ala Leu Thr Glu Ala Leu Val Lys Leu Val Gln Ala Gln	245	250	255													768
ggg gga aaa atc ctc act gac caa acc gtc aaa cgg gta ttg gtg gaa	Gly Gly Lys Ile Leu Thr Asp Gln Thr Val Lys Arg Val Leu Val Glu	260	265	270													816
aac aac cag gcg atc ggg gtg gag gta gct aac gga gaa cag tac cgg	Asn Asn Gln Ala Ile Gly Val Glu Val Ala Asn Gly Glu Gln Tyr Arg	275	280	285													864
gcc aaa aaa ggc gtg att tct aac atc gat gcc cgc cgt tta ttt ttg	Ala Lys Lys Gly Val Ile Ser Asn Ile Asp Ala Arg Arg Leu Phe Leu	290	295	300													912

## Fischfutter.ST25.txt

caa ttg gtg gaa ccg ggg gcc cta gcc aag gtg aat caa aac cta ggg Gln Leu Val Glu Pro Gly Ala Leu Ala Lys Val Asn Gln Asn Leu Gly 305 310 315 320	960
gaa cga ctg gaa cgg cgc act gtg aac aat aac gaa gcc att tta aaa Glu Arg Leu Glu Arg Arg Thr Val Asn Asn Asn Glu Ala Ile Leu Lys 325 330 335	1008
atc gat tgt gcc ctc tcc ggt tta ccc cac ttc act gcc atg gcc ggg Ile Asp Cys Ala Leu Ser Gly Leu Pro His Phe Thr Ala Met Ala Gly 340 345 350	1056
ccg gag gat cta acg gga act att ttg att gcc gac tcg gta cgc cat Pro Glu Asp Leu Thr Gly Thr Ile Leu Ile Ala Asp Ser Val Arg His 355 360 365	1104
gtc gag gaa gcc cac gcc ctc att gcc ttg ggg caa att ccc gat gct Val Glu Glu Ala His Ala Leu Ile Ala Leu Gly Gln Ile Pro Asp Ala 370 375 380	1152
aat ccg tct tta tat ttg gat att ccc act gta ttg gac ccc acc atg Asn Pro Ser Leu Tyr Leu Asp Ile Pro Thr Val Leu Asp Pro Thr Met 385 390 395 400	1200
gcc ccc cct ggg cag cac acc ctc tgg atc gaa ttt ttt gcc ccc tac Ala Pro Pro Gly Gln His Thr Leu Trp Ile Glu Phe Phe Ala Pro Tyr 405 410 415	1248
cgc atc gcc ggg ttg gaa ggg aca ggg tta atg ggc aca ggt tgg acc Arg Ile Ala Gly Leu Glu Gly Thr Gly Leu Met Gly Thr Gly Trp Thr 420 425 430	1296
gat gag tta aag gaa aaa gtg gcg gat cgg gtg att gat aaa tta acg Asp Glu Leu Lys Glu Lys Val Ala Asp Arg Val Ile Asp Lys Leu Thr 435 440 445	1344
gac tat gcc cct aac cta aaa tct ctg atc att ggt cgc cga gtg gaa Asp Tyr Ala Pro Asn Leu Lys Ser Leu Ile Ile Gly Arg Arg Val Glu 450 455 460	1392
agt ccc gcc gaa ctg gcc caa cgg ctg gga agt tac aac ggc aat gtc Ser Pro Ala Glu Leu Ala Gln Arg Leu Gly Ser Tyr Asn Gly Asn Val 465 470 475 480	1440
tat cat ctg gat atg agt ttg gac caa atg atg ttc ctc cgg cct cta Tyr His Leu Asp Met Ser Leu Asp Gln Met Met Phe Leu Arg Pro Leu 485 490 495	1488
ccg gaa att gcc aac tac caa acc ccc atc aaa aat ctt tac tta aca Pro Glu Ile Ala Asn Tyr Gln Thr Pro Ile Lys Asn Leu Tyr Leu Thr 500 505 510	1536
ggg gcg ggt acc cat ccc ggt ggc tcc ata tca ggt atg ccc ggt aga Gly Ala Gly Thr His Pro Gly Gly Ser Ile Ser Gly Met Pro Gly Arg 515 520 525	1584
aat tgc gct cgg gtc ttt tta aaa caa caa cgt cgt ttt tgg taa Asn Cys Ala Arg Val Phe Leu Lys Gln Gln Arg Arg Phe Trp 530 535 540	1629

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 542

&lt;212&gt; PRT

<213> *Synechococcus* sp.

&lt;400&gt; 12

Met Ile Thr Thr Asp Val Val Ile Ile Gly Ala Gly His Asn Gly Leu  
1 5 10 15

Val Cys Ala Ala Tyr Leu Leu Gln Arg Gly Leu Gly Val Thr Leu Leu  
20 25 30

Glu Lys Arg Glu Val Pro Gly Gly Ala Ala Thr Thr Glu Ala Leu Met  
35 40 45

Pro Glu Leu Ser Pro Gln Phe Arg Phe Asn Arg Cys Ala Ile Asp His  
50 55 60

Glu Phe Ile Phe Leu Gly Pro Val Leu Gln Glu Leu Asn Leu Ala Gln  
65 70 75 80

Tyr Gly Leu Glu Tyr Leu Phe Cys Asp Pro Ser Val Phe Cys Pro Gly  
85 90 95

Leu Asp Gly Gln Ala Phe Met Ser Tyr Arg Ser Leu Glu Lys Thr Cys  
100 105 110

Ala His Ile Ala Thr Tyr Ser Pro Arg Asp Ala Glu Lys Tyr Arg Gln  
115 120 125

Phe Val Asn Tyr Trp Thr Asp Leu Leu Asn Ala Val Gln Pro Ala Phe  
130 135 140

Asn Ala Pro Pro Gln Ala Leu Leu Asp Leu Ala Leu Asn Tyr Gly Trp  
145 150 155 160

Glu Asn Leu Lys Ser Val Leu Ala Ile Ala Gly Ser Lys Thr Lys Ala  
165 170 175

Leu Asp Phe Ile Arg Thr Met Ile Gly Ser Pro Glu Asp Val Leu Asn  
180 185 190

Glu Trp Phe Asp Ser Glu Arg Val Lys Ala Pro Leu Ala Arg Leu Cys  
195 200 205

Ser Glu Ile Gly Ala Pro Pro Ser Gln Lys Gly Ser Ser Ser Gly Met  
210 215 220

Met Met Val Ala Met Arg His Leu Glu Gly Ile Ala Arg Pro Lys Gly  
225 230 235 240

Gly Thr Gly Ala Leu Thr Glu Ala Leu Val Lys Leu Val Gln Ala Gln  
245 250 255

## Fischfutter.ST25.txt

Gly Gly Lys Ile Leu Thr Asp Gln Thr Val Lys Arg Val Leu Val Gly  
 260 265 270  
 Asn Asn Gln Ala Ile Gly Val Glu Val Ala Asn Gly Glu Gln Tyr Arg  
 275 280 285  
 Ala Lys Lys Gly Val Ile Ser Asn Ile Asp Ala Arg Arg Leu Phe Leu  
 290 295 300  
 Gln Leu Val Glu Pro Gly Ala Leu Ala Lys Val Asn Gln Asn Leu Gly  
 305 310 315 320  
 Glu Arg Leu Glu Arg Arg Thr Val Asn Asn Asn Glu Ala Ile Leu Lys  
 325 330 335  
 Ile Asp Cys Ala Leu Ser Gly Leu Pro His Phe Thr Ala Met Ala Gly  
 340 345 350  
 Pro Glu Asp Leu Thr Gly Thr Ile Leu Ile Ala Asp Ser Val Arg His  
 355 360 365  
 Val Glu Glu Ala His Ala Leu Ile Ala Leu Gly Gln Ile Pro Asp Ala  
 370 375 380  
 Asn Pro Ser Leu Tyr Leu Asp Ile Pro Thr Val Leu Asp Pro Thr Met  
 385 390 395 400  
 Ala Pro Pro Gly Gln His Thr Leu Trp Ile Glu Phe Phe Ala Pro Tyr  
 405 410 415  
 Arg Ile Ala Gly Leu Glu Gly Thr Gly Leu Met Gly Thr Gly Trp Thr  
 420 425 430  
 Asp Glu Leu Lys Glu Lys Val Ala Asp Arg Val Ile Asp Lys Leu Thr  
 435 440 445  
 Asp Tyr Ala Pro Asn Leu Lys Ser Leu Ile Ile Gly Arg Arg Val Glu  
 450 455 460  
 Ser Pro Ala Glu Leu Ala Gln Arg Leu Gly Ser Tyr Asn Gly Asn Val  
 465 470 475 480  
 Tyr His Leu Asp Met Ser Leu Asp Gln Met Met Phe Leu Arg Pro Leu  
 485 490 495  
 Pro Glu Ile Ala Asn Tyr Gln Thr Pro Ile Lys Asn Leu Tyr Leu Thr  
 500 505 510  
 Gly Ala Gly Thr His Pro Gly Gly Ser Ile Ser Gly Met Pro Gly Arg  
 515 520 525

## Fischfutter.ST25.txt

Asn Cys Ala Arg Val Phe Leu Lys Gln Gln Arg Arg Phe Trp  
 530 535 540

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 776

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Bradyrhizobium sp.

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(774)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 13

atg cat gca gca acc gcc aag gct act gag ttc ggg gcc tct cgg cgc	48
Met His Ala Ala Thr Ala Lys Ala Thr Glu Phe Gly Ala Ser Arg Arg	
1 5 10 15	
gac gat gcg agg cag cgc cgc gtc ggt ctc acg ctg gcc gcg gtc atc	96
Asp Asp Ala Arg Gln Arg Arg Val Gly Leu Thr Leu Ala Ala Val Ile	
20 25 30	
atc gcc gcc tgg ctg gtg ctg cat gtc ggt ctg atg ttc ttc tgg ccg	144
Ile Ala Ala Trp Leu Val Leu His Val Gly Leu Met Phe Phe Trp Pro	
35 40 45	
ctg acc ctt cac agc ctg ctg ccg gct ttg cct ctg gtg gtg ctg cag	192
Leu Thr Leu His Ser Leu Leu Pro Ala Leu Pro Leu Val Val Leu Gln	
50 55 60	
acc tgg ctc tat gta ggc ctg ttc atc atc gcg cat gac tgc atg cac	240
Thr Trp Leu Tyr Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala His Asp Cys Met His	
65 70 75 80	
ggc tcg ctg gtg ccg ttc aag ccg cag gtc aac cgc cgt atc gga cag	288
Gly Ser Leu Val Pro Phe Lys Pro Gln Val Asn Arg Arg Ile Gly Gln	
85 90 95	
ctc tgc ctg ttc ctc tat gcc ggg ttc tcc ttc gac gct ctc aat gtc	336
Leu Cys Leu Phe Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Phe Asp Ala Leu Asn Val	
100 105 110	
gag cac cac aag cat cac cgc cat ccc ggc acg gcc gag gat ccc gat	384
Glu His His Lys His His Arg His Pro Gly Thr Ala Glu Asp Pro Asp	
115 120 125	
ttc gac gag gtg ccg ccg cac ggc ttc tgg cac tgg ttc gcc agc ttt	432
Phe Asp Glu Val Pro Pro His Gly Phe Trp His Trp Phe Ala Ser Phe	
130 135 140	
ttc ctg cac tat ttc ggc tgg aag cag gtc gcg atc atc gca gcc gtc	480
Phe Leu His Tyr Phe Gly Trp Lys Gln Val Ala Ile Ile Ala Ala Val	
145 150 155 160	
tcg ctg gtt tat cag ctc gtc ttc gcc gtt ccc ttg cag aac atc ctg	528
Ser Leu Val Tyr Gln Leu Val Phe Ala Val Pro Leu Gln Asn Ile Leu	

## Fischfutter.ST25.txt

165										170					175				
ctg	ttc	tgg	gcg	ctg	ccc	ggg	ctg	ctg	tcg	gcg	ctg	cag	ctg	ttc	acc	576			
Leu	Phe	Trp	Ala	Leu	Pro	Gly	Leu	Leu	Ser	Ala	Leu	Gln	Leu	Phe	Thr				
			180				185						190						
ttc	ggc	acc	tat	ctg	ccg	cac	aag	ccg	gcc	acg	cag	ccc	ttc	gcc	gat	624			
Phe	Gly	Thr	Tyr	Leu	Pro	His	Lys	Pro	Ala	Thr	Gln	Pro	Phe	Ala	Asp				
		195					200					205							
cgc	cac	aac	gcg	cgg	acg	agc	gaa	ttt	ccc	gcg	tgg	ctg	tcg	ctg	ctg	672			
Arg	His	Asn	Ala	Arg	Thr	Ser	Glu	Phe	Pro	Ala	Trp	Leu	Ser	Leu	Leu				
	210					215					220								
acc	tgc	ttc	cac	ttc	ggc	ttt	cat	cac	gag	cat	cat	ctg	cat	ccc	gat	720			
Thr	Cys	Phe	His	Phe	Gly	Phe	His	His	Glu	His	His	Leu	His	Pro	Asp				
225					230					235					240				
gcg	ccg	tgg	tgg	cgg	ctg	ccg	gag	atc	aag	cgg	cgg	gcc	ctg	gaa	agg	768			
Ala	Pro	Trp	Trp	Arg	Leu	Pro	Glu	Ile	Lys	Arg	Arg	Ala	Leu	Glu	Arg				
				245					250					255					
cgt	gac	ta														776			
Arg	Asp																		

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 258

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Bradyrhizobium sp.

&lt;400&gt; 14

Met His Ala Ala Thr Ala Lys Ala Thr Glu Phe Gly Ala Ser Arg Arg  
1 5 10 15

Asp Asp Ala Arg Gln Arg Arg Val Gly Leu Thr Leu Ala Ala Val Ile  
20 25 30

Ile Ala Ala Trp Leu Val Leu His Val Gly Leu Met Phe Phe Trp Pro  
35 40 45

Leu Thr Leu His Ser Leu Leu Pro Ala Leu Pro Leu Val Val Leu Gln  
50 55 60

Thr Trp Leu Tyr Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala His Asp Cys Met His  
65 70 75 80

Gly Ser Leu Val Pro Phe Lys Pro Gln Val Asn Arg Arg Ile Gly Gln  
85 90 95

Leu Cys Leu Phe Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Phe Asp Ala Leu Asn Val  
100 105 110

Glu His His Lys His His Arg His Pro Gly Thr Ala Glu Asp Pro Asp

115 Fischfutter.ST25.txt  
120 125

Phe Asp Glu Val Pro Pro His Gly Phe Trp His Trp Phe Ala Ser Phe  
130 135 140

Phe Leu His Tyr Phe Gly Trp Lys Gln Val Ala Ile Ile Ala Ala Val  
145 150 155 160

Ser Leu Val Tyr Gln Leu Val Phe Ala Val Pro Leu Gln Asn Ile Leu  
165 170 175

Leu Phe Trp Ala Leu Pro Gly Leu Leu Ser Ala Leu Gln Leu Phe Thr  
180 185 190

Phe Gly Thr Tyr Leu Pro His Lys Pro Ala Thr Gln Pro Phe Ala Asp  
195 200 205

Arg His Asn Ala Arg Thr Ser Glu Phe Pro Ala Trp Leu Ser Leu Leu  
210 215 220

Thr Cys Phe His Phe Gly Phe His His Glu His His Leu His Pro Asp  
225 230 235 240

Ala Pro Trp Trp Arg Leu Pro Glu Ile Lys Arg Arg Ala Leu Glu Arg  
245 250 255

Arg Asp

<210> 15

<211> 777

<212> DNA

<213> Nostoc sp.

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(777)

<223>

<400> 15

atg gtt cag tgt caa cca tca tct ctg cat tca gaa aaa ctg gtg tta  
Met Val Gln Cys Gln Pro Ser Ser Leu His Ser Glu Lys Leu Val Leu  
1 5 10 15

48

ttg tca tcg aca atc aga gat gat aaa aat att aat aag ggt ata ttt  
Leu Ser Ser Thr Ile Arg Asp Asp Lys Asn Ile Asn Lys Gly Ile Phe  
20 25 30

96

Fischfutter.ST25.txt

att gcc tgc ttt atc tta ttt tta tgg gca att agt tta atc tta tta	144
Ile Ala Cys Phe Ile Leu Phe Leu Trp Ala Ile Ser Leu Ile Leu Leu	
35 40 45	
ctc tca ata gat aca tcc ata att cat aag agc tta tta ggt ata gcc	192
Leu Ser Ile Asp Thr Ser Ile Ile His Lys Ser Leu Leu Gly Ile Ala	
50 55 60	
atg ctt tgg cag acc ttc tta tat aca ggt tta ttt att act gct cat	240
Met Leu Trp Gln Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His	
65 70 75 80	
gat gcc atg cac ggc gta gtt tat ccc aaa aat ccc aga ata aat aat	288
Asp Ala Met His Gly Val Val Tyr Pro Lys Asn Pro Arg Ile Asn Asn	
85 90 95	
ttt ata ggt aag ctc act cta atc ttg tat gga cta ctc cct tat aaa	336
Phe Ile Gly Lys Leu Thr Leu Ile Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Lys	
100 105 110	
gat tta ttg aaa aaa cat tgg tta cac cac gga cat cct ggt act gat	384
Asp Leu Leu Lys Lys His Trp Leu His His Gly His Pro Gly Thr Asp	
115 120 125	
tta gac cct gat tat tac aat ggt cat ccc caa aac ttc ttt ctt tgg	432
Leu Asp Pro Asp Tyr Tyr Asn Gly His Pro Gln Asn Phe Phe Leu Trp	
130 135 140	
tat cta cat ttt atg aag tct tat tgg cga tgg acg caa att ttc gga	480
Tyr Leu His Phe Met Lys Ser Tyr Trp Arg Trp Thr Gln Ile Phe Gly	
145 150 155 160	
tta gtg atg att ttt cat gga ctt aaa aat ctg gtg cat ata cca gaa	528
Leu Val Met Ile Phe His Gly Leu Lys Asn Leu Val His Ile Pro Glu	
165 170 175	
aat aat tta att ata ttt tgg atg ata cct tct att tta agt tca gta	576
Asn Asn Leu Ile Ile Phe Trp Met Ile Pro Ser Ile Leu Ser Ser Val	
180 185 190	
caa cta ttt tat ttt ggt aca ttt ttg cct cat aaa aag cta gaa ggt	624
Gln Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Lys Lys Leu Glu Gly	
195 200 205	
ggt tat act aac ccc cat tgt gcg cgc agt atc cca tta cct ctt ttt	672
Gly Tyr Thr Asn Pro His Cys Ala Arg Ser Ile Pro Leu Pro Leu Phe	
210 215 220	
tgg tct ttt gtt act tgt tat cac ttc ggc tac cac aag gaa cat cac	720
Trp Ser Phe Val Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Lys Glu His His	
225 230 235 240	
gaa tac cct caa ctt cct tgg tgg aaa tta cct gaa gct cac aaa ata	768
Glu Tyr Pro Gln Leu Pro Trp Trp Lys Leu Pro Glu Ala His Lys Ile	
245 250 255	
tct tta taa	777
Ser Leu	

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 258

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Nostoc sp.



&lt;400&gt; 16

Met Val Gln Cys Gln Pro Ser Ser Leu His Ser Glu Lys Leu Val Leu  
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Thr Ile Arg Asp Asp Lys Asn Ile Asn Lys Gly Ile Phe  
 20 25 30

Ile Ala Cys Phe Ile Leu Phe Leu Trp Ala Ile Ser Leu Ile Leu Leu  
 35 40 45

Leu Ser Ile Asp Thr Ser Ile Ile His Lys Ser Leu Leu Gly Ile Ala  
 50 55 60

Met Leu Trp Gln Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His  
 65 70 75 80

Asp Ala Met His Gly Val Val Tyr Pro Lys Asn Pro Arg Ile Asn Asn  
 85 90 95

Phe Ile Gly Lys Leu Thr Leu Ile Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Lys  
 100 105 110

Asp Leu Leu Lys Lys His Trp Leu His His Gly His Pro Gly Thr Asp  
 115 120 125

Leu Asp Pro Asp Tyr Tyr Asn Gly His Pro Gln Asn Phe Phe Leu Trp  
 130 135 140

Tyr Leu His Phe Met Lys Ser Tyr Trp Arg Trp Thr Gln Ile Phe Gly  
 145 150 155 160

Leu Val Met Ile Phe His Gly Leu Lys Asn Leu Val His Ile Pro Glu  
 165 170 175

Asn Asn Leu Ile Ile Phe Trp Met Ile Pro Ser Ile Leu Ser Ser Val  
 180 185 190

Gln Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Lys Lys Leu Glu Gly  
 195 200 205

Gly Tyr Thr Asn Pro His Cys Ala Arg Ser Ile Pro Leu Pro Leu Phe  
 210 215 220

Trp Ser Phe Val Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Lys Glu His His  
 225 230 235 240

Glu Tyr Pro Gln Leu Pro Trp Trp Lys Leu Pro Glu Ala His Lys Ile  
 245 250 255

## Fischfutter.ST25.txt

Ser Leu

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 1608

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Haematococcus pluvialis

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (3)..(971)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 17

ct	aca	ttt	cac	aag	ccc	gtg	agc	ggt	gca	agc	gct	ctg	ccc	cac	atc	47
Thr	Phe	His	Lys	Pro	Val	Ser	Gly	Ala	Ser	Ala	Leu	Pro	His	Ile		
1				5				10						15		

ggc	cca	cct	cct	cat	ctc	cat	cgg	tca	ttt	gct	gct	acc	acg	atg	ctg	95
Gly	Pro	Pro	Pro	His	Leu	His	Arg	Ser	Phe	Ala	Ala	Thr	Thr	Met	Leu	
				20				25						30		

tcg	aag	ctg	cag	tca	atc	agc	gtc	aag	gcc	cgc	cgc	gtt	gaa	cta	gcc	143
Ser	Lys	Leu	Gln	Ser	Ile	Ser	Val	Lys	Ala	Arg	Arg	Val	Glu	Leu	Ala	
			35					40					45			

cgc	gac	atc	acg	cgg	ccc	aaa	gtc	tgc	ctg	cat	gct	cag	cgg	tgc	tcg	191
Arg	Asp	Ile	Thr	Arg	Pro	Lys	Val	Cys	Leu	His	Ala	Gln	Arg	Cys	Ser	
		50					55					60				

tta	gtt	cgg	ctg	cga	gtg	gca	gca	cca	cag	aca	gag	gag	gcg	ctg	gga	239
Leu	Val	Arg	Leu	Arg	Val	Ala	Ala	Pro	Gln	Thr	Glu	Glu	Ala	Leu	Gly	
	65					70					75					

acc	gtg	cag	gct	gcc	ggc	gcg	ggc	gat	gag	cac	agc	gcc	gat	gta	gca	287
Thr	Val	Gln	Ala	Ala	Gly	Ala	Gly	Asp	Glu	His	Ser	Ala	Asp	Val	Ala	
80					85					90					95	

ctc	cag	cag	ctt	gac	cgg	gct	atc	gca	gag	cgt	cgt	gcc	cgg	cgc	aaa	335
Leu	Gln	Gln	Leu	Asp	Arg	Ala	Ile	Ala	Glu	Arg	Arg	Ala	Arg	Arg	Lys	
				100					105					110		

cgg	gag	cag	ctg	tca	tac	cag	gct	gcc	gcc	att	gca	gca	tca	att	ggc	383
Arg	Glu	Gln	Leu	Ser	Tyr	Gln	Ala	Ala	Ala	Ile	Ala	Ala	Ser	Ile	Gly	
			115					120					125			

gtg	tca	ggc	att	gcc	atc	ttc	gcc	acc	tac	ctg	aga	ttt	gcc	atg	cac	431
Val	Ser	Gly	Ile	Ala	Ile	Phe	Ala	Thr	Tyr	Leu	Arg	Phe	Ala	Met	His	
		130					135					140				

atg	acc	gtg	ggc	ggc	gca	gtg	cca	tgg	ggt	gaa	gtg	gct	ggc	act	ctc	479
Met	Thr	Val	Gly	Gly	Ala	Val	Pro	Trp	Gly	Glu	Val	Ala	Gly	Thr	Leu	
	145					150					155					

ctc	ttg	gtg	gtt	ggt	ggc	gcg	ctc	ggc	atg	gag	atg	tat	gcc	cgc	tat	527
Leu	Leu	Val	Val	Gly	Gly	Ala	Leu	Gly	Met	Glu	Met	Tyr	Ala	Arg	Tyr	

Fischfutter.ST25.txt

160	165	170	175	
gca cac aaa gcc atc tgg cat gag tcg cct ctg ggc tgg ctg ctg cac				575
Ala His Lys Ala Ile Trp His Glu Ser Pro Leu Gly Trp Leu Leu His	180	185	190	
aag agc cac cac aca cct cgc act gga ccc ttt gaa gcc aac gac ttg				623
Lys Ser His His Thr Pro Arg Thr Gly Pro Phe Glu Ala Asn Asp Leu	195	200	205	
ttt gca atc atc aat gga ctg ccc gcc atg ctc ctg tgt acc ttt ggc				671
Phe Ala Ile Ile Asn Gly Leu Pro Ala Met Leu Leu Cys Thr Phe Gly	210	215	220	
ttc tgg ctg ccc aac gtc ctg ggg gcg gcc tgc ttt gga gcg ggg ctg				719
Phe Trp Leu Pro Asn Val Leu Gly Ala Ala Cys Phe Gly Ala Gly Leu	225	230	235	
ggc atc acg cta tac ggc atg gca tat atg ttt gta cac gat ggc ctg				767
Gly Ile Thr Leu Tyr Gly Met Ala Tyr Met Phe Val His Asp Gly Leu	240	245	250	255
gtg cac agg cgc ttt ccc acc ggg ccc atc gct ggc ctg ccc tac atg				815
Val His Arg Arg Phe Pro Thr Gly Pro Ile Ala Gly Leu Pro Tyr Met	260	265	270	
aag cgc ctg aca gtg gcc cac cag cta cac cac agc ggc aag tac ggt				863
Lys Arg Leu Thr Val Ala His Gln Leu His His Ser Gly Lys Tyr Gly	275	280	285	
ggc gcg ccc tgg ggt atg ttc ttg ggt cca cag gag ctg cag cac att				911
Gly Ala Pro Trp Gly Met Phe Leu Gly Pro Gln Glu Leu Gln His Ile	290	295	300	
cca ggt gcg gcg gag gag gtg gag cga ctg gtc ctg gaa ctg gac tgg				959
Pro Gly Ala Ala Glu Glu Val Glu Arg Leu Val Glu Glu Leu Asp Trp	305	310	315	
tcc aag cgg tag ggtgcggaac caggcacgct ggtttcacac ctcatgcctg				1011
Ser Lys Arg	320			
tgataaggtg tggctagagc gatgcgtgtg agacgggtat gtcacggtcg actggtctga				1071
tggccaatgg catcggccat gtctgggtcat cacgggctgg ttgcctgggt gaaggtgatg				1131
cacatcatca tgtgcggttg gaggggctgg cacagtgtgg gctgaactgg agcagttgtc				1191
caggctggcg ttgaatcagt gagggtttgt gattggcggg tgtgaagcaa tgactccgcc				1251
catattctat ttgtgggagc tgagatgatg gcatgcttgg gatgtgcatg gatcatggta				1311
gtgcagcaaa ctatattcac ctagggtgtg tggtaggatc aggtgaggcc ttgcacattg				1371
catgatgtac tcgtcatggg gtgttggtga gaggatggat gtggatggat gtgtattctc				1431
agacgtagac cttgactgga ggcttgatcg agagagtggg ccgtattctt tgagagggga				1491
ggctcgtgcc agaaatggtg agtggatgac tgtgacgctg tacattgcag gcaggtgaga				1551
tgcactgtct cgattgtaaa atacattcag atgcaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa				1608
<210>	18			
<211>	322			
<212>	PRT			

Fischfutter.ST25.txt

&lt;213&gt; Haematococcus pluvialis

&lt;400&gt; 18

Thr Phe His Lys Pro Val Ser Gly Ala Ser Ala Leu Pro His Ile Gly  
 1 5 10 15  
 Pro Pro Pro His Leu His Arg Ser Phe Ala Ala Thr Thr Met Leu Ser  
 20 25 30  
 Lys Leu Gln Ser Ile Ser Val Lys Ala Arg Arg Val Glu Leu Ala Arg  
 35 40 45  
 Asp Ile Thr Arg Pro Lys Val Cys Leu His Ala Gln Arg Cys Ser Leu  
 50 55 60  
 Val Arg Leu Arg Val Ala Ala Pro Gln Thr Glu Glu Ala Leu Gly Thr  
 65 70 75 80  
 Val Gln Ala Ala Gly Ala Gly Asp Glu His Ser Ala Asp Val Ala Leu  
 85 90 95  
 Gln Gln Leu Asp Arg Ala Ile Ala Glu Arg Arg Ala Arg Arg Lys Arg  
 100 105 110  
 Glu Gln Leu Ser Tyr Gln Ala Ala Ala Ile Ala Ala Ser Ile Gly Val  
 115 120 125  
 Ser Gly Ile Ala Ile Phe Ala Thr Tyr Leu Arg Phe Ala Met His Met  
 130 135 140  
 Thr Val Gly Gly Ala Val Pro Trp Gly Glu Val Ala Gly Thr Leu Leu  
 145 150 155 160  
 Leu Val Val Gly Gly Ala Leu Gly Met Glu Met Tyr Ala Arg Tyr Ala  
 165 170 175  
 His Lys Ala Ile Trp His Glu Ser Pro Leu Gly Trp Leu Leu His Lys  
 180 185 190  
 Ser His His Thr Pro Arg Thr Gly Pro Phe Glu Ala Asn Asp Leu Phe  
 195 200 205  
 Ala Ile Ile Asn Gly Leu Pro Ala Met Leu Leu Cys Thr Phe Gly Phe  
 210 215 220  
 Trp Leu Pro Asn Val Leu Gly Ala Ala Cys Phe Gly Ala Gly Leu Gly  
 225 230 235 240  
 Ile Thr Leu Tyr Gly Met Ala Tyr Met Phe Val His Asp Gly Leu Val

## Fischfutter.ST25.txt

245

250

255

His Arg Arg Phe Pro Thr Gly Pro Ile Ala Gly Leu Pro Tyr Met Lys  
 260 265 270

Arg Leu Thr Val Ala His Gln Leu His His Ser Gly Lys Tyr Gly Gly  
 275 280 285

Ala Pro Trp Gly Met Phe Leu Gly Pro Gln Glu Leu Gln His Ile Pro  
 290 295 300

Gly Ala Ala Glu Glu Val Glu Arg Leu Val Leu Glu Leu Asp Trp Ser  
 305 310 315 320

Lys Arg

<210> 19

<211> 1503

<212> DNA

<213> Tomate

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1503)

<223>

<400> 19

atg gat act ttg ttg aaa acc cca aat aac ctt gaa ttt ctg aac cca	48
Met Asp Thr Leu Leu Lys Thr Pro Asn Asn Leu Glu Phe Leu Asn Pro	
1 5 10 15	

cat cat ggt ttt gct gtt aaa gct agt acc ttt aga tct gag aag cat	96
His His Gly Phe Ala Val Lys Ala Ser Thr Phe Arg Ser Glu Lys His	
20 25 30	

cat aat ttt ggt tct agg aag ttt tgt gaa act ttg ggt aga agt gtt	144
His Asn Phe Gly Ser Arg Lys Phe Cys Glu Thr Leu Gly Arg Ser Val	
35 40 45	

tgt gtt aag ggt agt agt agt gct ctt tta gag ctt gta cct gag acc	192
Cys Val Lys Gly Ser Ser Ser Ala Leu Leu Glu Leu Val Pro Glu Thr	
50 55 60	

aaa aag gag aat ctt gat ttt gag ctt cct atg tat gac cct tca aaa	240
Lys Lys Glu Asn Leu Asp Phe Glu Leu Pro Met Tyr Asp Pro Ser Lys	
65 70 75 80	

ggg gtt gtt gtg gat ctt gct gtg gtt ggt ggt ggc cct gca gga ctt	288
Gly Val Val Val Asp Leu Ala Val Val Gly Gly Gly Pro Ala Gly Leu	
85 90 95	

Fischfutter.ST25.txt																	
gct	ggt	gca	cag	caa	ggt	tct	gaa	gca	gga	ctc	tct	ggt	tgt	tca	att		336
Ala	Val	Ala	Gln	Gln	Val	Ser	Glu	Ala	Gly	Leu	Ser	Val	Cys	Ser	Ile		
		100						105					110				
gat	ccg	aat	cct	aaa	ttg	ata	tgg	cct	aat	aac	tat	ggt	ggt	tgg	gtg		384
Asp	Pro	Asn	Pro	Lys	Leu	Ile	Trp	Pro	Asn	Asn	Tyr	Gly	Val	Trp	Val		
		115					120					125					
gat	gaa	ttt	gag	gct	atg	gac	ttg	tta	gat	tgt	cta	gat	gct	acc	tgg		432
Asp	Glu	Phe	Glu	Ala	Met	Asp	Leu	Leu	Asp	Cys	Leu	Asp	Ala	Thr	Trp		
	130					135					140						
tct	ggt	gca	gca	gtg	tac	att	gat	gat	aat	acg	gct	aaa	gat	ctt	cat		480
Ser	Gly	Ala	Ala	Val	Tyr	Ile	Asp	Asp	Asn	Thr	Ala	Lys	Asp	Leu	His		
145					150					155					160		
aga	cct	tat	gga	agg	ggt	aac	cgg	aaa	cag	ctg	aaa	tcg	aaa	atg	atg		528
Arg	Pro	Tyr	Gly	Arg	Val	Asn	Arg	Lys	Gln	Leu	Lys	Ser	Lys	Met	Met		
				165					170					175			
cag	aaa	tgt	ata	atg	aat	ggt	ggt	aaa	ttc	cac	caa	gcc	aaa	ggt	ata		576
Gln	Lys	Cys	Ile	Met	Asn	Gly	Val	Lys	Phe	His	Gln	Ala	Lys	Val	Ile		
			180					185					190				
aag	gtg	att	cat	gag	gaa	tcg	aaa	tcc	atg	ttg	ata	tgc	aat	gat	ggt		624
Lys	Val	Ile	His	Glu	Glu	Ser	Lys	Ser	Met	Leu	Ile	Cys	Asn	Asp	Gly		
		195					200					205					
att	act	att	cag	gca	acg	gtg	gtg	ctc	gat	gca	act	ggc	ttc	tct	aga		672
Ile	Thr	Ile	Gln	Ala	Thr	Val	Val	Leu	Asp	Ala	Thr	Gly	Phe	Ser	Arg		
	210					215					220						
tct	ctt	ggt	cag	tat	gat	aag	cct	tat	aac	ccc	ggg	tat	caa	ggt	gct		720
Ser	Leu	Val	Gln	Tyr	Asp	Lys	Pro	Tyr	Asn	Pro	Gly	Tyr	Gln	Val	Ala		
225					230					235					240		
tat	ggc	att	ttg	gct	gaa	gtg	gaa	gag	cac	ccc	ttt	gat	gta	aac	aag		768
Tyr	Gly	Ile	Leu	Ala	Glu	Val	Glu	Glu	His	Pro	Phe	Asp	Val	Asn	Lys		
				245					250					255			
atg	ggt	ttc	atg	gat	tgg	cga	gat	tct	cat	ttg	aag	aac	aat	act	gat		816
Met	Val	Phe	Met	Asp	Trp	Arg	Asp	Ser	His	Leu	Lys	Asn	Asn	Thr	Asp		
			260					265					270				
ctc	aag	gag	aga	aat	agt	aga	ata	cca	act	ttt	ctt	tat	gca	atg	cca		864
Leu	Lys	Glu	Arg	Asn	Ser	Arg	Ile	Pro	Thr	Phe	Leu	Tyr	Ala	Met	Pro		
		275					280					285					
ttt	tca	tcc	aac	agg	ata	ttt	ctt	gaa	gaa	aca	tca	ctc	gta	gct	cgt		912
Phe	Ser	Ser	Asn	Arg	Ile	Phe	Leu	Glu	Glu	Thr	Ser	Leu	Val	Ala	Arg		
	290					295					300						
cct	ggc	ttg	cgt	ata	gat	gat	att	caa	gaa	cga	atg	gtg	gct	cgt	tta		960
Pro	Gly	Leu	Arg	Ile	Asp	Asp	Ile	Gln	Glu	Arg	Met	Val	Ala	Arg	Leu		
305					310					315					320		
aac	cat	ttg	ggg	ata	aaa	gtg	aag	agc	att	gaa	gaa	gat	gaa	cat	tgt		1008
Asn	His	Leu	Gly	Ile	Lys	Val	Lys	Ser	Ile	Glu	Glu	Asp	Glu	His	Cys		
				325					330					335			
cta	ata	cca	atg	ggt	ggt	cca	ctt	cca	gta	tta	cct	cag	aga	gtc	gtt		1056
Leu	Ile	Pro	Met	Gly	Gly	Pro	Leu	Pro	Val	Leu	Pro	Gln	Arg	Val	Val		
			340					345					350				
gga	atc	ggt	ggt	aca	gct	ggc	atg	gtt	cat	cca	tcc	acc	ggt	tat	atg		1104
Gly	Ile	Gly	Gly	Thr	Ala	Gly	Met	Val	His	Pro	Ser	Thr	Gly	Tyr	Met		
		355					360					365					

## Fischfutter.ST25.txt

gtg gca agg aca cta gct gcg gct cct gtt gtt gcc aat gcc ata att	1152
Val Ala Arg Thr Leu Ala Ala Ala Pro Val Val Ala Asn Ala Ile Ile	
370 375 380	
caa tac ctc ggt tct gaa aga agt cat tcg ggt aat gaa tta tcc aca	1200
Gln Tyr Leu Gly Ser Glu Arg Ser His Ser Gly Asn Glu Leu Ser Thr	
385 390 395 400	
gct gtt tgg aaa gat ttg tgg cct ata gag agg aga cgt caa aga gag	1248
Ala Val Trp Lys Asp Leu Trp Pro Ile Glu Arg Arg Arg Gln Arg Glu	
405 410 415	
ttc ttc tgc ttc ggt atg gat att ctt ctg aag ctt gat tta cct gct	1296
Phe Phe Cys Phe Gly Met Asp Ile Leu Leu Lys Leu Asp Leu Pro Ala	
420 425 430	
aca aga agg ttc ttt gat gca ttc ttt gac tta gaa cct cgt tat tgg	1344
Thr Arg Arg Phe Phe Asp Ala Phe Phe Asp Leu Glu Pro Arg Tyr Trp	
435 440 445	
cat ggc ttc tta tcg tct cga ttg ttt cta cct gaa ctc ata gtt ttt	1392
His Gly Phe Leu Ser Ser Arg Leu Phe Leu Pro Glu Leu Ile Val Phe	
450 455 460	
ggg ctg tct cta ttc tct cat gct tca aat act tct aga ttt gag ata	1440
Gly Leu Ser Leu Phe Ser His Ala Ser Asn Thr Ser Arg Phe Glu Ile	
465 470 475 480	
atg aca aag gga act gtt cca tta gta aat atg atc aac aat ttg tta	1488
Met Thr Lys Gly Thr Val Pro Leu Val Asn Met Ile Asn Asn Leu Leu	
485 490 495	
cag gat aaa gaa tga	1503
Gln Asp Lys Glu	
500	

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 500

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Tomate

&lt;400&gt; 20

Met Asp Thr Leu Leu Lys Thr Pro Asn Asn Leu Glu Phe Leu Asn Pro
1 5 10 15
His His Gly Phe Ala Val Lys Ala Ser Thr Phe Arg Ser Glu Lys His
20 25 30
His Asn Phe Gly Ser Arg Lys Phe Cys Glu Thr Leu Gly Arg Ser Val
35 40 45
Cys Val Lys Gly Ser Ser Ser Ala Leu Leu Glu Leu Val Pro Glu Thr
50 55 60
Lys Lys Glu Asn Leu Asp Phe Glu Leu Pro Met Tyr Asp Pro Ser Lys
65 70 75 80

## Fischfutter.ST25.txt

Gly Val Val Val Asp Leu Ala Val Val Gly Gly Gly Pro Ala Gly Leu  
 85 90 95  
 Ala Val Ala Gln Gln Val Ser Glu Ala Gly Leu Ser Val Cys Ser Ile  
 100 105 110  
 Asp Pro Asn Pro Lys Leu Ile Trp Pro Asn Asn Tyr Gly Val Trp Val  
 115 120 125  
 Asp Glu Phe Glu Ala Met Asp Leu Leu Asp Cys Leu Asp Ala Thr Trp  
 130 135 140  
 Ser Gly Ala Ala Val Tyr Ile Asp Asp Asn Thr Ala Lys Asp Leu His  
 145 150 155 160  
 Arg Pro Tyr Gly Arg Val Asn Arg Lys Gln Leu Lys Ser Lys Met Met  
 165 170 175  
 Gln Lys Cys Ile Met Asn Gly Val Lys Phe His Gln Ala Lys Val Ile  
 180 185 190  
 Lys Val Ile His Glu Glu Ser Lys Ser Met Leu Ile Cys Asn Asp Gly  
 195 200 205  
 Ile Thr Ile Gln Ala Thr Val Val Leu Asp Ala Thr Gly Phe Ser Arg  
 210 215 220  
 Ser Leu Val Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Asn Pro Gly Tyr Gln Val Ala  
 225 230 235 240  
 Tyr Gly Ile Leu Ala Glu Val Glu Glu His Pro Phe Asp Val Asn Lys  
 245 250 255  
 Met Val Phe Met Asp Trp Arg Asp Ser His Leu Lys Asn Asn Thr Asp  
 260 265 270  
 Leu Lys Glu Arg Asn Ser Arg Ile Pro Thr Phe Leu Tyr Ala Met Pro  
 275 280 285  
 Phe Ser Ser Asn Arg Ile Phe Leu Glu Glu Thr Ser Leu Val Ala Arg  
 290 295 300  
 Pro Gly Leu Arg Ile Asp Asp Ile Gln Glu Arg Met Val Ala Arg Leu  
 305 310 315 320  
 Asn His Leu Gly Ile Lys Val Lys Ser Ile Glu Glu Asp Glu His Cys  
 325 330 335  
 Leu Ile Pro Met Gly Gly Pro Leu Pro Val Leu Pro Gln Arg Val Val  
 340 345 350



## Fischfutter.ST25.txt

Gly Ile Gly Gly Thr Ala Gly Met Val His Pro Ser Thr Gly Tyr Met  
 355 360 365

Val Ala Arg Thr Leu Ala Ala Ala Pro Val Val Ala Asn Ala Ile Ile  
 370 375 380

Gln Tyr Leu Gly Ser Glu Arg Ser His Ser Gly Asn Glu Leu Ser Thr  
 385 390 395 400

Ala Val Trp Lys Asp Leu Trp Pro Ile Glu Arg Arg Arg Gln Arg Glu  
 405 410 415

Phe Phe Cys Phe Gly Met Asp Ile Leu Leu Lys Leu Asp Leu Pro Ala  
 420 425 430

Thr Arg Arg Phe Phe Asp Ala Phe Phe Asp Leu Glu Pro Arg Tyr Trp  
 435 440 445

His Gly Phe Leu Ser Ser Arg Leu Phe Leu Pro Glu Leu Ile Val Phe  
 450 455 460

Gly Leu Ser Leu Phe Ser His Ala Ser Asn Thr Ser Arg Phe Glu Ile  
 465 470 475 480

Met Thr Lys Gly Thr Val Pro Leu Val Asn Met Ile Asn Asn Leu Leu  
 485 490 495

Gln Asp Lys Glu  
 500

<210> 21

<211> 195

<212> DNA

<213> Kartoffel

<220>

<221> Intron

<222> (1)..(195)

<223>

<400> 21  
 tacgtaagtt tctgcttcta cctttgatat atatataata attatcatta attagtagta 60  
 atataatatt tcaaataattt ttttcaaaat aaaagaatgt agtatatagc aattgctttt 120  
 ctgtagttta taagtgtgta tattttaatt tataactttt ctaatatatg accaaaattt 180

gttgatgtgc agctg

195

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 1155

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Haematococcus pluvialis

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (6)..(995)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 22

gaagc	atg	cag	cta	gca	gcg	aca	gta	atg	ttg	gag	cag	ctt	acc	gga	agc		50
	Met	Gln	Leu	Ala	Ala	Thr	Val	Met	Leu	Glu	Gln	Leu	Thr	Gly	Ser		
1					5					10					15		
gct	gag	gca	ctc	aag	gag	aag	gag	aag	gag	ggt	gca	ggc	agc	tct	gac		98
Ala	Glu	Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	Glu	Lys	Glu	Val	Ala	Gly	Ser	Ser	Asp		
				20					25					30			
gtg	ttg	cgt	aca	tgg	gcg	acc	cag	tac	tcg	ctt	ccg	tca	gag	gag	tca		146
Val	Leu	Arg	Thr	Trp	Ala	Thr	Gln	Tyr	Ser	Leu	Pro	Ser	Glu	Glu	Ser		
			35					40					45				
gac	gcg	gcc	cgc	ccg	gga	ctg	aag	aat	gcc	tac	aag	cca	cca	cct	tcc		194
Asp	Ala	Ala	Arg	Pro	Gly	Leu	Lys	Asn	Ala	Tyr	Lys	Pro	Pro	Pro	Ser		
		50					55					60					
gac	aca	aag	ggc	atc	aca	atg	gcg	cta	gct	gtc	atc	ggc	tcc	tgg	ggc		242
Asp	Thr	Lys	Gly	Ile	Thr	Met	Ala	Leu	Ala	Val	Ile	Gly	Ser	Trp	Ala		
	65					70					75						
gca	gtg	ttc	ctc	cac	gcc	att	ttt	caa	atc	aag	ctt	ccg	acc	tcc	ttg		290
Ala	Val	Phe	Leu	His	Ala	Ile	Phe	Gln	Ile	Lys	Leu	Pro	Thr	Ser	Leu		
80					85					90					95		
gac	cag	ctg	cac	tgg	ctg	ccc	gtg	tca	gat	gcc	aca	gct	cag	ctg	ggt		338
Asp	Gln	Leu	His	Trp	Leu	Pro	Val	Ser	Asp	Ala	Thr	Ala	Gln	Leu	Val		
				100					105					110			
agc	ggc	agc	agc	agc	ctg	ctg	cac	atc	gtc	gta	gta	ttc	ttt	gtc	ctg		386
Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Leu	Leu	His	Ile	Val	Val	Val	Phe	Phe	Val	Leu		
			115					120					125				
gag	ttc	ctg	tac	aca	ggc	ctt	ttt	atc	acc	acg	cat	gat	gct	atg	cat		434
Glu	Phe	Leu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Phe	Ile	Thr	Thr	His	Asp	Ala	Met	His		
		130				135						140					
ggc	acc	atc	gcc	atg	aga	aac	agg	cag	ctt	aat	gac	ttc	ttg	ggc	aga		482
Gly	Thr	Ile	Ala	Met	Arg	Asn	Arg	Gln	Leu	Asn	Asp	Phe	Leu	Gly	Arg		
	145					150					155						
gta	tgc	atc	tcc	ttg	tac	gcc	tgg	ttt	gat	tac	aac	atg	ctg	cac	cgc		530
Val	Cys	Ile	Ser	Leu	Tyr	Ala	Trp	Phe	Asp	Tyr	Asn	Met	Leu	His	Arg		
160					165				170						175		

## Fischfutter.ST25.txt

aag cat tgg gag cac cac aac cac act ggc gag gtg ggc aag gac cct 578  
Lys His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro  
180 185 190  
gac ttc cac agg gga aac cct ggc att gtg ccc tgg ttt gcc agc ttc 626  
Asp Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe  
195 200 205  
atg tcc agc tac atg tcg atg tgg cag ttt gcg cgc ctc gca tgg tgg 674  
Met Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp  
210 215 220  
acg gtg gtc atg cag ctg ctg ggt gcg cca atg gcg aac ctg ctg gtg 722  
Thr Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val  
225 230 235  
ttc atg gcg gcc gcg ccc atc ctg tcc gcc ttc cgc ttg ttc tac ttt 770  
Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe  
240 245 250 255  
ggc acg tac atg ccc cac aag cct gag cct ggc gcc gcg tca ggc tct 818  
Gly Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser  
260 265 270  
tca cca gcc gtc atg aac tgg tgg aag tcg cgc act agc cag gcg tcc 866  
Ser Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser  
275 280 285  
gac ctg gtc agc ttt ctg acc tgc tac cac ttc gac ctg cac tgg gag 914  
Asp Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu  
290 295 300  
cac cac cgc tgg ccc ttt gcc ccc tgg tgg gag ctg ccc aac tgc cgc 962  
His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg  
305 310 315  
cgc ctg tct ggc cga ggt ctg gtt cct gcc tag ctggacacac tgcagtgggc 1015  
Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala  
320 325  
cctgctgccca gctgggcatg cagggtgtgg caggactggg tgagggtgaaa agctgcaggc 1075  
gctgctgccg gacacgctgc atgggctacc ctgtgtagct gccgccacta ggggaggggg 1135  
ttgtgtagctg tcgagcttgc 1155

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 329

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Haematococcus pluvialis

&lt;400&gt; 23

Met Gln Leu Ala Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala  
1 5 10 15

Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp Val  
20 25 30

Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser Asp

82/145

315

Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala  
325

<213> Haematococcus pluvialis

**<223>**

480

## Fischfutter.ST25.txt

cac	cg	aag	cat	tgg	gag	cac	cac	aac	cac	act	ggc	gag	gtg	ggc	aag	528
His	Arg	Lys	His	Trp	Glu	His	His	Asn	His	Thr	Gly	Glu	Val	Gly	Lys	
160					165					170					175	
gac	cct	gac	ttc	cac	agg	gga	aac	cct	ggc	att	gtg	ccc	tgg	ttt	gcc	576
Asp	Pro	Asp	Phe	His	Arg	Gly	Asn	Pro	Gly	Ile	Val	Pro	Trp	Phe	Ala	
				180					185					190		
agc	ttc	atg	tcc	agc	tac	atg	tcg	atg	tgg	cag	ttt	gcg	cg	ctc	gca	624
Ser	Phe	Met	Ser	Ser	Tyr	Met	Ser	Met	Trp	Gln	Phe	Ala	Arg	Leu	Ala	
			195					200				205				
tgg	tgg	acg	gtg	gtc	atg	cag	ctg	ctg	ggt	gcg	cca	atg	gcg	aac	ctg	672
Trp	Trp	Thr	Val	Val	Met	Gln	Leu	Leu	Gly	Ala	Pro	Met	Ala	Asn	Leu	
		210					215					220				
ctg	gtg	ttc	atg	gcg	gcc	gcg	ccc	atc	ctg	tcc	gcc	ttc	cg	ttg	ttc	720
Leu	Val	Phe	Met	Ala	Ala	Ala	Pro	Ile	Leu	Ser	Ala	Phe	Arg	Leu	Phe	
		225				230					235					
tac	ttt	ggc	acg	tac	atg	ccc	cac	aag	cct	gag	cct	ggc	gcc	gcg	tca	768
Tyr	Phe	Gly	Thr	Tyr	Met	Pro	His	Lys	Pro	Glu	Pro	Gly	Ala	Ala	Ser	
240					245					250					255	
ggc	tct	tca	cca	gcc	gtc	atg	aac	tgg	tgg	aag	tcg	cg	act	agc	cag	816
Gly	Ser	Ser	Pro	Ala	Val	Met	Asn	Trp	Trp	Lys	Ser	Arg	Thr	Ser	Gln	
				260					265					270		
gcg	tcc	gac	ctg	gtc	agc	ttt	ctg	acc	tgc	tac	cac	ttc	gac	ctg	cac	864
Ala	Ser	Asp	Leu	Val	Ser	Phe	Leu	Thr	Cys	Tyr	His	Phe	Asp	Leu	His	
			275					280					285			
tgg	gag	cac	cac	cg	tgg	ccc	ttc	gcc	ccc	tgg	tgg	gag	ctg	ccc	aac	912
Trp	Glu	His	His	Arg	Trp	Pro	Phe	Ala	Pro	Trp	Trp	Glu	Leu	Pro	Asn	
		290					295					300				
tgc	cg	cg	ctg	tct	ggc	cga	ggt	ctg	gtt	cct	gcc	tag	ctgg	acac		961
Cys	Arg	Arg	Leu	Ser	Gly	Arg	Gly	Leu	Val	Pro	Ala					
	305					310					315					
tgcagtgggc	cctgctgcca	gctgggcatg	caggttgtgg	caggactggg	tgaggtgaaa											1021
agctgcaggc	gctgctgccc	gacacgttgc	atgggctacc	ctgtgtagct	gccgccacta											1081
ggggaggggg	tttgtagctg	tcgagcttgc														1111

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 315

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Haematococcus pluvialis

&lt;400&gt; 25

Met	Leu	Glu	Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	Glu	Lys	Glu	Val	Ala	Gly	Ser	Ser
1				5				10						15	

Asp	Val	Leu	Arg	Thr	Trp	Ala	Thr	Gln	Tyr	Ser	Leu	Pro	Ser	Glu	Glu
			20					25					30		

Ser	Asp	Ala	Ala	Arg	Pro	Gly	Leu	Lys	Asn	Ala	Tyr	Lys	Pro	Pro	Pro
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Fischfutter.ST25.txt  
40 45

35

Ser Asp Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser Trp  
 50 55 60  
 Ala Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser  
 65 70 75 80  
 Leu Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu  
 85 90 95  
 Val Ser Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Val Val Val Phe Phe Val  
 100 105 110  
 Leu Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met  
 115 120 125  
 His Gly Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly  
 130 135 140  
 Arg Val Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His  
 145 150 155 160  
 Arg Lys His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp  
 165 170 175  
 Pro Asp Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser  
 180 185 190  
 Phe Met Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp  
 195 200 205  
 Trp Thr Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu  
 210 215 220  
 Val Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr  
 225 230 235 240  
 Phe Gly Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly  
 245 250 255  
 Ser Ser Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala  
 260 265 270  
 Ser Asp Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp  
 275 280 285  
 Glu His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys  
 290 295 300  
 Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala

Fischfutter.ST25.txt  
315

305

310

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 1031

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Haematococcus pluvialis

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (6)..(1031)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 26

gaagc	atg	cag	cta	gca	gcg	aca	gta	atg	ttg	gag	cag	ctt	acc	gga	agc	50
	Met	Gln	Leu	Ala	Ala	Thr	Val	Met	Leu	Glu	Gln	Leu	Thr	Gly	Ser	
1				5					10					15		
gct	gag	gca	ctc	aag	gag	aag	gag	aag	gag	gtt	gca	ggc	agc	tct	gac	98
Ala	Glu	Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	Glu	Lys	Glu	Val	Ala	Gly	Ser	Ser	Asp	
			20						25					30		
gtg	ttg	cgt	aca	tgg	gcg	acc	cag	tac	tcg	ctt	ccg	tca	gag	gag	tca	146
Val	Leu	Arg	Thr	Trp	Ala	Thr	Gln	Tyr	Ser	Leu	Pro	Ser	Glu	Glu	Ser	
			35					40					45			
gac	gcg	gcc	cgc	ccg	gga	ctg	aag	aat	gcc	tac	aag	cca	cca	cct	tcc	194
Asp	Ala	Ala	Arg	Pro	Gly	Leu	Lys	Asn	Ala	Tyr	Lys	Pro	Pro	Pro	Ser	
		50					55					60				
gac	aca	aag	ggc	atc	aca	atg	gcg	cta	gct	gtc	atc	ggc	tcc	tgg	gct	242
Asp	Thr	Lys	Gly	Ile	Thr	Met	Ala	Leu	Ala	Val	Ile	Gly	Ser	Trp	Ala	
	65					70					75					
gca	gtg	ttc	ctc	cac	gcc	att	ttt	caa	atc	aag	ctt	ccg	acc	tcc	ttg	290
Ala	Val	Phe	Leu	His	Ala	Ile	Phe	Gln	Ile	Lys	Leu	Pro	Thr	Ser	Leu	
	80				85					90					95	
gac	cag	ctg	cac	tgg	ctg	ccc	gtg	tca	gat	gcc	aca	gct	cag	ctg	gtt	338
Asp	Gln	Leu	His	Trp	Leu	Pro	Val	Ser	Asp	Ala	Thr	Ala	Gln	Leu	Val	
				100					105					110		
agc	ggc	agc	agc	agc	ctg	ctg	cac	atc	gtc	gta	gta	ttc	ttt	gtc	ctg	386
Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Leu	Leu	His	Ile	Val	Val	Val	Phe	Phe	Val	Leu	
			115					120					125			
gag	ttc	ctg	tac	aca	ggc	ctt	ttt	atc	acc	acg	cat	gat	gct	atg	cat	434
Glu	Phe	Leu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Phe	Ile	Thr	Thr	His	Asp	Ala	Met	His	
		130					135					140				
ggc	acc	atc	gcc	atg	aga	aac	agg	cag	ctt	aat	gac	ttc	ttg	ggc	aga	482
Gly	Thr	Ile	Ala	Met	Arg	Asn	Arg	Gln	Leu	Asn	Asp	Phe	Leu	Gly	Arg	
		145				150					155					
gta	tgc	atc	tcc	ttg	tac	gcc	tgg	ttt	gat	tac	aac	atg	ctg	cac	cgc	530
Val	Cys	Ile	Ser	Leu	Tyr	Ala	Trp	Phe	Asp	Tyr	Asn	Met	Leu	His	Arg	
					165					170					175	



## Fischfutter.ST25.txt

aag cat tgg gag cac cac aac cac act ggc gag gtg ggc aag gac cct 578  
Lys His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro  
180 185 190  
gac ttc cac agg gga aac cct ggc att gtg ccc tgg ttt gcc agc ttc 626  
Asp Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe  
195 200 205  
atg tcc agc tac atg tcg atg tgg cag ttt gcg cgc ctc gca tgg tgg 674  
Met Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp  
210 215 220  
acg gtg gtc atg cag ctg ctg ggt gcg cca atg gcg aac ctg ctg gtg 722  
Thr Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val  
225 230 235  
ttc atg gcg gcc gcg ccc atc ctg tcc gcc ttc cgc ttg ttc tac ttt 770  
Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe  
240 245 250 255  
ggc acg tac atg ccc cac aag cct gag cct ggc gcc gcg tca ggc tct 818  
Gly Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser  
260 265 270  
tca cca gcc gtc atg aac tgg tgg aag tcg cgc act agc cag gcg tcc 866  
Ser Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser  
275 280 285  
gac ctg gtc agc ttt ctg acc tgc tac cac ttc gac ctg cac tgg gag 914  
Asp Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu  
290 295 300  
cac cac cgc tgg ccc ttt gcc ccc tgg tgg gag ctg ccc aac tgc cgc 962  
His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg  
305 310 315  
cgc ctg tct ggc cga ggt ctg gtt cct gcc gag caa aaa ctc atc tca 1010  
Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser  
320 325 330 335  
gaa gag gat ctg aat agc tag 1031  
Glu Glu Asp Leu Asn Ser  
340

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 341

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Haematococcus pluvialis

&lt;400&gt; 27

Met Gln Leu Ala Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala  
1 5 10 15  
Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp Val  
20 25 30  
Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser Asp  
35 40 45

## Fischfutter.ST25.txt

Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser Asp  
 50 55 60  
 Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser Trp Ala Ala  
 65 70 75 80  
 Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu Asp  
 85 90 95  
 Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val Ser  
 100 105 110  
 Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu Glu  
 115 120 125  
 Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His Gly  
 130 135 140  
 Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg Val  
 145 150 155 160  
 Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg Lys  
 165 170 175  
 His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp  
 180 185 190  
 Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met  
 195 200 205  
 Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp Thr  
 210 215 220  
 Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val Phe  
 225 230 235 240  
 Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly  
 245 250 255  
 Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser Ser  
 260 265 270  
 Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser Asp  
 275 280 285  
 Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu His  
 290 295 300  
 His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg  
 305 310 315 320



## Fischfutter.ST25.txt

<221> primer\_bind

<222> (1)..(22)

<223>

<400> 29  
gcaagctcga cagctacaaa cc

22

<210> 30

<211> 24

<212> DNA

<213> kuenstlich

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(24)

<223>

<400> 30  
gaagcatgca gctagcagcg acag

24

<210> 31

<211> 30

<212> DNA

<213> kuenstlich

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(30)

<223>

<400> 31  
tgcattgctag aggcactcaa ggagaaggag

30

<210> 32

<211> 59

<212> DNA

<213> kuenstlich

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(59)

<223>

<400> 32  
ctagctattc agatcctctt ctgagatgag tttttgctcg gcaggaacca gacctcggc 59

<210> 33

<211> 28

<212> DNA

<213> kuenstlich

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(28)

<223>

<400> 33  
gagctcactc actgatttcc attgcttg 28

<210> 34

<211> 37

<212> DNA

<213> kuenstlich

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(37)

<223>

<400> 34  
cgccgttaag tcgatgtccg ttgatttaaa cagtgtc 37

<210> 35

<211> 34

<212> DNA  
<213> kuenstlich

<220>  
<221> primer\_bind  
<222> (1)..(34)  
<223>

<400> 35  
atcaacggac atcgacttaa cggcgtttgt aaac

34

<210> 36  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> kuenstlich

<220>  
<221> primer\_bind  
<222> (1)..(25)  
<223>

<400> 36  
taagcttttt gttgaagaga tttgg

25

<210> 37  
<211> 212  
<212> DNA  
<213> kuenstliche Sequenz

<220>  
<221> Intron  
<222> (1)..(212)  
<223>

<400> 37  
gtcgactacg taagtttctg cttctacctt tgatatatat ataataatta tcattaatta

60

Fischfutter.ST25.txt

gtagtaatat aatatttcaa atattttttt caaaataaaa gaatgtagta tatagcaatt 120  
gcttttctgt agtttataag tgtgtatatt ttaatttata acttttctaa tatatgacca 180  
aaatttgttg atgtgcaggt atcaccggat cc 212

**<210> 38**

**<211> 1830**

**<212> DNA**

**<213> Tagetes erecta**

**<220>**

**<221> CDS**

<222> (141)..(1691)

**<223>**

**<400> 38**

ggcacgaggc aaagcaaagg ttgtttgttg ttgttgttga gagacactcc aatccaaaca 60

qatacaagqc qtgactqqat atttctctct cgttcctaac aacagcaacg aagaagaaaa 120

agaatcatta ctaacaatca atg agt atg aga gct gga cac atg acg gca aca 173  
Met Ser Met Arg Ala Gly His Met Thr Ala Thr  
1 5 10

atg gcg gct ttt aca tgc cct agg ttt atg act agc atc aga tac acg 221  
Met Ala Ala Phe Thr Cys Pro Arg Phe Met Thr Ser Ile Arg Tyr Thr  
15 20 25

aag caa att aag tgc aac gct gct aaa agc cag cta gtc gtt aaa caa 269  
Lys Gln Ile Lys Cys Asn Ala Ala Lys Ser Gln Leu Val Val Lys Gln  
30 35 40

gag att gag gag gaa gaa gat tat gtg aaa gcc ggt gga tcg gag ctg 317  
Glu Ile Glu Glu Glu Glu Asp Tyr Val Lys Ala Gly Gly Ser Glu Leu  
45 50 55

ctt ttt gtt caa atg caa cag aat aag tcc atg gat gca cag tct agc 365  
Leu Phe Val Gln Met Gln Gln Asn Lys Ser Met Asp Ala Gln Ser Ser  
60 65 70 75

cta tcc caa aag ctc cca agg gta cca ata gga gga gga gga gac agt 413  
Leu Ser Gln Lys Leu Pro Arg Val Pro Ile Gly Gly Gly Gly Asp Ser  
80 85 90

aac tgt ata ctg gat ttg gtt gta att ggt tgt ggt cct gct ggc ctt 461  
Asn Cys Ile Leu Asp Leu Val Val Ile Gly Cys Gly Pro Ala Gly Leu  
95 100 105

gct ctt gct gga gaa tca gcc aag cta ggc ttg aat gtc gca ctt atc 509  
Ala Leu Ala Gly Glu Ser Ala Lys Leu Gly Leu Asn Val Ala Leu Ile  
110 115 120

ggc cct gat ctt cct ttt aca aat aac tat ggt gtt tgg gag gat gaa 557  
Gly Pro Asp Leu Pro Phe Thr Asn Asn Tyr Gly Val Trp Glu Asp Glu  
125 130 135

## Fischfutter.ST25.txt

ttt Phe 140	ata Ile	ggt Gly	ctt Leu	gga Gly 145	ctt Leu 145	gag Glu	ggc Gly	tgt Cys	att Ile	gaa Glu 150	cat His	gtt Val	tgg Trp	cga Arg	gat Asp 155	605
act Thr	gta Val	gta Val	tat Tyr 160	ctt Leu 160	gat Asp	gac Asp	aac Asn	gat Asp	ccc Pro 165	att Ile	ctc Leu	ata Ile	ggt Gly	cgt Arg 170	gcc Ala	653
tat Tyr	gga Gly	cga Arg	gtt Val 175	agt Ser	cgt Arg	gat Asp	tta Leu	ctt Leu 180	cac His	gag Glu	gag Glu	ttg Leu	ttg Leu 185	act Thr	agg Arg	701
tgc Cys	atg Met	gag Glu 190	tca Ser	ggc Gly	gtt Val	tca Ser	tat Tyr 195	ctg Leu	agc Ser	tcc Ser	aaa Lys	gtg Val 200	gaa Glu	cgg Arg	att Ile	749
act Thr	gaa Glu 205	gct Ala	cca Pro	aat Asn	ggc Gly 210	cta Leu 210	agt Ser	ctc Leu	ata Ile	gag Glu 215	tgt Cys 215	gaa Glu	ggc Gly	aat Asn	atc Ile	797
aca Thr 220	att Ile	cca Pro	tgc Cys	agg Arg	ctt Leu 225	gct Ala	act Thr	gtc Val	gct Ala	tct Ser 230	gga Gly	gca Ala	gct Ala	tct Ser	gga Gly 235	845
aaa Lys	ctt Leu	ttg Leu	cag Gln 240	tat Tyr	gaa Glu	ctt Leu	ggc Gly	ggg Gly	ccc Pro 245	cgt Arg	gtt Val	tgc Cys	gtt Val	caa Gln 250	aca Thr	893
gct Ala	tat Tyr	ggt Gly	ata Ile 255	gag Glu	gtt Val	gag Glu	gtt Val	gaa Glu 260	agc Ser	ata Ile	ccc Pro	tat Tyr	gat Asp 265	cca Pro	agc Ser	941
cta Leu	atg Met 270	gtt Val	ttc Phe	atg Met	gat Asp	tat Tyr	aga Arg 275	gac Asp	tac Tyr	acc Thr	aaa Lys	cat His 280	aaa Lys	tct Ser	caa Gln	989
tca Ser 285	cta Leu	gaa Glu	gca Ala	caa Gln	tat Tyr	cca Pro 290	aca Thr	ttt Phe	ttg Leu	tat Tyr	gtc Val 295	atg Met	cca Pro	atg Met	tct Ser	1037
cca Pro 300	act Thr	aaa Lys	gta Val	ttc Phe	ttt Phe 305	gag Glu	gaa Glu	act Thr	tgt Cys	ttg Leu 310	gct Ala	tca Ser	aaa Lys	gag Glu	gcc Ala 315	1085
atg Met	cct Pro	ttt Phe	gag Glu 320	tta Leu	ttg Leu	aag Lys	aca Thr	aaa Lys	ctc Leu 325	atg Met	tca Ser	aga Arg	tta Leu	aag Lys 330	act Thr	1133
atg Met	ggg Gly	atc Ile	cga Arg 335	ata Ile	acc Thr	aaa Lys	act Thr	tat Tyr 340	gaa Glu	gag Glu	gaa Glu	tgg Trp	tca Ser	tat Tyr	att Ile	1181
cca Pro	gta Val	ggt Gly 350	gga Gly	tcc Ser	tta Leu	cca Pro	aat Asn 355	acc Thr	gag Glu	caa Gln	aag Lys	aac Asn 360	ctt Leu	gca Ala	ttt Phe	1229
ggt Gly	gct Ala 365	gct Ala	gct Ala	agc Ser	atg Met	gtg Val 370	cat His	cca Pro	gcc Ala	aca Thr	gga Gly 375	tat Tyr	tcg Ser	gtt Val	gta Val	1277
aga Arg 380	tca Ser	ctg Leu	tca Ser	gaa Glu	gct Ala 385	cct Pro	aat Asn	tat Tyr	gca Ala	gca Ala 390	gta Val	att Ile	gca Ala	aag Lys	att Ile 395	1325
tta Leu	ggg Gly	aaa Lys	gga Gly	aat Asn 400	tca Ser	aaa Lys	cag Gln	atg Met	ctt Leu 405	gat Asp	cat His	gga Gly	aga Arg	tac Tyr 410	aca Thr	1373



## Fischfutter.ST25.txt

acc aac atc tca aag caa gct tgg gaa aca ctt tgg ccc ctt gaa agg 1421  
 Thr Asn Ile Ser Lys Gln Ala Trp Glu Thr Leu Trp Pro Leu Glu Arg  
 415 420 425

aaa aga cag aga gca ttc ttt ctc ttt gga tta gca ctg att gtc cag 1469  
 Lys Arg Gln Arg Ala Phe Phe Leu Phe Gly Leu Ala Leu Ile Val Gln  
 430 435 440

atg gat att gag ggg acc cgc aca ttc ttc cgg act ttc ttc cgc ttg 1517  
 Met Asp Ile Glu Gly Thr Arg Thr Phe Phe Arg Thr Phe Phe Arg Leu  
 445 450 455

ccc aca tgg atg tgg tgg ggg ttt ctt gga tct tcg tta tca tca act 1565  
 Pro Thr Trp Met Trp Trp Gly Phe Leu Gly Ser Ser Leu Ser Ser Thr  
 460 465 470 475

gac ttg ata ata ttt gcg ttt tac atg ttt atc ata gca ccg cat agc 1613  
 Asp Leu Ile Ile Phe Ala Phe Tyr Met Phe Ile Ile Ala Pro His Ser  
 480 485 490

ctg aga atg ggt ctg gtt aga cat ttg ctt tct gac ccg aca gga gga 1661  
 Leu Arg Met Gly Leu Val Arg His Leu Leu Ser Asp Pro Thr Gly Gly  
 495 500 505

aca atg tta aaa gcg tat ctc acg ata taa ataactctag tcgcgatcag 1711  
 Thr Met Leu Lys Ala Tyr Leu Thr Ile  
 510 515

tttagattat aggcacatct tgcataatata tatgtataaa ccttatgtgt gctgtatcct 1771

tacatcaaca cagtcattaa ttgtatttct tggggtaatg ctgatgaagt attttctgg 1830

<210> 39

<211> 516

<212> PRT

<213> Tagetes erecta

<400> 39

Met Ser Met Arg Ala Gly His Met Thr Ala Thr Met Ala Ala Phe Thr  
 1 5 10 15

Cys Pro Arg Phe Met Thr Ser Ile Arg Tyr Thr Lys Gln Ile Lys Cys  
 20 25 30

Asn Ala Ala Lys Ser Gln Leu Val Val Lys Gln Glu Ile Glu Glu Glu  
 35 40 45

Glu Asp Tyr Val Lys Ala Gly Gly Ser Glu Leu Leu Phe Val Gln Met  
 50 55 60

Gln Gln Asn Lys Ser Met Asp Ala Gln Ser Ser Leu Ser Gln Lys Leu  
 65 70 75 80

Pro Arg Val Pro Ile Gly Gly Gly Gly Asp Ser Asn Cys Ile Leu Asp  
 85 90 95

## Fischfutter.ST25.txt

Leu Val Val Ile Gly Cys Gly Pro Ala Gly Leu Ala Leu Ala Gly Glu  
 100 105 110  
 Ser Ala Lys Leu Gly Leu Asn Val Ala Leu Ile Gly Pro Asp Leu Pro  
 115 120 125  
 Phe Thr Asn Asn Tyr Gly Val Trp Glu Asp Glu Phe Ile Gly Leu Gly  
 130 135 140  
 Leu Glu Gly Cys Ile Glu His Val Trp Arg Asp Thr Val Val Tyr Leu  
 145 150 155 160  
 Asp Asp Asn Asp Pro Ile Leu Ile Gly Arg Ala Tyr Gly Arg Val Ser  
 165 170 175  
 Arg Asp Leu Leu His Glu Glu Leu Leu Thr Arg Cys Met Glu Ser Gly  
 180 185 190  
 Val Ser Tyr Leu Ser Ser Lys Val Glu Arg Ile Thr Glu Ala Pro Asn  
 195 200 205  
 Gly Leu Ser Leu Ile Glu Cys Glu Gly Asn Ile Thr Ile Pro Cys Arg  
 210 215 220  
 Leu Ala Thr Val Ala Ser Gly Ala Ala Ser Gly Lys Leu Leu Gln Tyr  
 225 230 235 240  
 Glu Leu Gly Gly Pro Arg Val Cys Val Gln Thr Ala Tyr Gly Ile Glu  
 245 250 255  
 Val Glu Val Glu Ser Ile Pro Tyr Asp Pro Ser Leu Met Val Phe Met  
 260 265 270  
 Asp Tyr Arg Asp Tyr Thr Lys His Lys Ser Gln Ser Leu Glu Ala Gln  
 275 280 285  
 Tyr Pro Thr Phe Leu Tyr Val Met Pro Met Ser Pro Thr Lys Val Phe  
 290 295 300  
 Phe Glu Glu Thr Cys Leu Ala Ser Lys Glu Ala Met Pro Phe Glu Leu  
 305 310 315 320  
 Leu Lys Thr Lys Leu Met Ser Arg Leu Lys Thr Met Gly Ile Arg Ile  
 325 330 335  
 Thr Lys Thr Tyr Glu Glu Glu Trp Ser Tyr Ile Pro Val Gly Gly Ser  
 340 345 350  
 Leu Pro Asn Thr Glu Gln Lys Asn Leu Ala Phe Gly Ala Ala Ala Ser  
 355 360 365

## Fischfutter.ST25.txt

Met Val His Pro Ala Thr Gly Tyr Ser Val Val Arg Ser Leu Ser Glu  
 370 375 380

Ala Pro Asn Tyr Ala Ala Val Ile Ala Lys Ile Leu Gly Lys Gly Asn  
 385 390 395 400

Ser Lys Gln Met Leu Asp His Gly Arg Tyr Thr Thr Asn Ile Ser Lys  
 405 410 415

Gln Ala Trp Glu Thr Leu Trp Pro Leu Glu Arg Lys Arg Gln Arg Ala  
 420 425 430

Phe Phe Leu Phe Gly Leu Ala Leu Ile Val Gln Met Asp Ile Glu Gly  
 435 440 445

Thr Arg Thr Phe Phe Arg Thr Phe Phe Arg Leu Pro Thr Trp Met Trp  
 450 455 460

Trp Gly Phe Leu Gly Ser Ser Leu Ser Ser Thr Asp Leu Ile Ile Phe  
 465 470 475 480

Ala Phe Tyr Met Phe Ile Ile Ala Pro His Ser Leu Arg Met Gly Leu  
 485 490 495

Val Arg His Leu Leu Ser Asp Pro Thr Gly Gly Thr Met Leu Lys Ala  
 500 505 510

Tyr Leu Thr Ile  
 515

<210> 40

<211> 445

<212> DNA

<213> Tagetes erecta

<220>

<221> Sense Fragment

<222> (1)..(445)

<223>

<400> 40

aagcttgac gaggcaaagc aaagggtggt tgttggtggt gttgagagac actccaatcc 60

aaacagatac aaggcgtgac tggatatttc tctctcgttc ctaacaacag caacgaagaa 120

gaaaaagaat cattactaac aatcaatgag tatgagagct ggacacatga cggcaacaat 180

## Fischfutter.ST25.txt

ggcggctttt acatgcccta ggtttatgac tagcatcaga tacacgaagc aaattaagtg	240
caacgctgct aaaagccagc tagtcgttaa acaagagatt gaggaggaag aagattatgt	300
gaaagccggt ggatcggagc tgctttttgt tcaaatagca cagaataagt ccatggatgc	360
acagtctagc ctatcccaaa agctcccaag ggtaccaata ggaggaggag gagacagtaa	420
ctgtatactg gatttggttg tcgac	445

&lt;210&gt; 41

&lt;211&gt; 446

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Tagetes erecta

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Antisense Fragment

&lt;222&gt; (1)..(446)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 41

gaattcgcac gaggcaaagc aaagggtggt tggtgtgtgt gttgagagac actccaatcc	60
aaacagatac aaggcgtgac tggatatttc tctctcgttc ctaacaacag caacgaagaa	120
gaaaaagaat cactactaac aatcaatgag tatgagagct ggacacatga cggcaacaat	180
ggcggctttt acatgcccta ggtttatgac tagcatcaga tacacgaagc aaattaagtg	240
caacgctgct aaaagccagc tagtcgttaa acaagagatt gaggaggaag aagattatgt	300
gaaagccggt ggatcggagc tgctttttgt tcaaatagca cagaataagt ccatggatgc	360
acagtctagc ctatcccaaa agctcccaag ggtaccaata ggaggaggag gagacagtaa	420
ctgtatactg gatttggttg gaccc	446

&lt;210&gt; 42

&lt;211&gt; 393

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Tagetes erecta

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Sense Fragment

&lt;222&gt; (1)..(393)

&lt;223&gt;

## Fischfutter.ST25.txt

<400> 42  
aagcttttga ttagcactga ttgtccagat ggatattgag gggacccgca cattcttccg 60  
gactttcttc cgcttgccca catggatgtg gtgggggttt cttggatctt cgttatcatc 120  
aactgacttg ataatatattg cgttttacat gtttatcata gcaccgcata gcctgagaat 180  
gggtctgggt agacatttgc tttctgaccc gacaggagga acaatgttaa aagcgtatct 240  
cacgatataa ataactctag tcgcgatcag tttagattat aggacatct tgcatatata 300  
tatgtataaa ccttatgtgt gctgtatcct tacatcaaca cagtcattaa ttgtatttct 360  
tggggtaatg ctgatgaagt attttctgtc gac 393

<210> 43

<211> 397

<212> DNA

<213> Tagetes erecta

<220>

<221> Antisense Fragment

<222> (1)..(397)

<223>

<400> 43  
gaattctctt tggattagca ctgattgtcc agatggatat tgaggggacc cgcacattct 60  
tccggacttt ctccgcttg cccacatgga tgtggtgggg gtttcttgga tcttcgttat 120  
catcaactga cttgataata tttgcgtttt acatgtttat catagcaccg catagcctga 180  
gaatgggtct ggttagacat ttgctttctg acccgacagg aggaacaatg ttaaaagcgt 240  
atctcacgat ataaataact ctagtcgcga tcagtttaga ttataggcac atcttgcata 300  
tatatatgta taaaccttat gtgtgctgta tccttacatc aacacagtca ttaattgtat 360  
ttcttggggg aatgctgatg aagtattttc tggatcc 397

<210> 44

<211> 1537

<212> DNA

<213> -

<220>

<221> promoter

<222> (1)..(1537)

&lt;223&gt;

```

<400> 44
gagctctaca aattaggggtt actttattca ttttcatcca ttctctttat tgttaaattt 60
tgtacattta ttcaataata ttatatgttt attacaaatt ctcactttct tattcatacc 120
tattcactca agcctttacc atcttccttt tctatttcaa tactatttct acttcatttt 180
tcacgttttt aacatctttc tttatttctt gtccacttcg tttagggatg cctaattgtcc 240
caaatttcat ctctcgtagt aacacaaaac caatgtaatg ctacttctct ctacattttt 300
aatacaata aagtgaacaa aaatatctat aaataaaca atatatatat tttgttagac 360
gctgtctcaa cccatcaatt aaaaaatttt gttatatttc tactttacct actaaatttg 420
tttctcatat ttacctttta acccccacaa aaaaaaatta taaaaaagaa agaaaaaagc 480
taaaccctat ttaaataagct aactataaga tcttaaaatt atcctcatca gtgtatagtt 540
taattgggta ttaacttata acattatata tctatgacat atactctctc ctagctattt 600
ctcacatttt ttaacttaag aaaatagtca taacatagtc taaaattcaa acatccacat 660
gctctaattt gattaacaaa aagttagaaa tattttattta aataaaaaag actaataaat 720
atataaaatg aatgttcata cgcagacca tttagagatg agtatgcttt cacatgctga 780
gattattttc aaaactaagg ttgtagcaat attaaatcaa taaaattatt ataaataaca 840
aaattaacct gctcgtgttt gctgtatatg ggaggctaca aaataaatta aactaaagat 900
gattatgttt tagacatttt ttctatctgt attagtttat acatattaat tcaggagctg 960
cacaacccaa ttctattttc gttccttggt ggctgggttt ctcaagggt tcaatagtca 1020
atattaggtt ttattggact ttaatagta tcaaacaat ctatgtgtga acttaaaaat 1080
tgtattaaat atttagggta acctgttgcc gtttttagaa taatgtttct tcttaataca 1140
cgaaagcgta ttgtgtattc attcatttgg cgcctcacat gcttcggttg gctcgcttta 1200
gtctctgcct tctttgtata ttgtactccc cctcttctta tgccacgtgt tctgagctta 1260
acaagccacg ttgcgtgccca ttgccaaaca agtcatttta acttcacaag gtccgatttg 1320
acctcaaaa caacgacaag tttccgaaca gtcgcaaga tcaagggtat aatcgtcttt 1380
ttgaattcta tttctcttta ttaatagtc cctctcgtgt gatagttttt aaaagatttt 1440
taaacgtag ctgctgttta agtaaattccc agtccttcag tttgtgcttt tgtgtgtttt 1500
gtttctctga ttacggaat ttggaaataa taagctt 1537

```

&lt;210&gt; 45

&lt;211&gt; 734

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; kuenstliche Sequenz

## Fischfutter.ST25.txt

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; variation

&lt;222&gt; (1)..(734)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 45

ctaacaatca atgagtagag agctggacac atgacggcaa caatggcggc ttttacatgc	60
cctagggttta tgactagcat cagatacacg aagcaaatta agtgcaacgc tgctaaaagc	120
cagctagtcg ttaaacaaga gattgaggag gaagaagatt atgtgaaagc cggtaggatcg	180
gagctgcttt ttgttcaaatt gcaacagaat aagtccatgg atgcacagtc tagcctatcc	240
caaaagggtca ctccagactt aattgcttat aaataaataa atatgttttt taggaataat	300
gatatttaga tagattagct atcacctgtg ctgtggtgtg cagctcccaa gggctctacc	360
gatagtaaaa tcgttagtta tgattaatac ttgggagggtg ggggattata ggctttgttg	420
tgagaatggt gagaaagagg ttgacaaat cgggtgtttga atgagggttaa atggagtta	480
attaaaataa agagaagaga aagattaaga ggggtgatggg gatattaaag acggscaata	540
tagtgatgcc acgtagaaaa aggtaagtga aaacatacaa cgtggcttta aaagatggct	600
tggctgctaa tcaactcaac tcaactcata tcctatccat tcaaattcaa ttcaattcta	660
ttgaatgcaa agcaaagcaa aggttggttg ttgttggtgt tgagagacac tccaatccaa	720
acagatacaa ggcg	734

&lt;210&gt; 46

&lt;211&gt; 280

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; kuenstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; variation

&lt;222&gt; (1)..(280)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 46

gtcagagtatg gagttcaatt aaaataaaga gaagaraaag attaagaggg tgatggggat	60
attaaagacg gccaatrtag tgatgccacg taagaaaaag gtaagtgaaa acatacaacg	120
tggctttaaa agatggcttg gctgctaact aactcaactc aactcatatc ctatccattc	180
aaattcaatt caattctatt gaatgcaaag caaagcaaag caaagggtgt ttgttggtgt	240

Fischfutter.ST25.txt

tgttgagaga cactccaatc caaacagata caaggcgtga

280

&lt;210&gt; 47

&lt;211&gt; 358

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Tagetes erecta

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Sense Promotor

&lt;222&gt; (1)..(358)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 47

aagcttaccg atagtaaaat cgttagttat gattaatact tgggaggtgg gggattatag 60

gctttgttgt gagaatgttg agaaagaggt ttgacaaatc ggtgtttgaa tgagggttaa 120

tggagtttaa ttaaaataaa gagaagagaa agattaagag ggtgatgggg atattaaaga 180

cggccaatat agtgatgcca cgtagaaaaa ggtaagtga aacatacaac gtggctttaa 240

aagatggctt ggctgctaata caactcaact caactcatat cctatccatt caaattcaat 300

tcaattctat tgaatgcaaa gcaaagcaaa gcaaagggtt tttgttggtt ttgtcgac 358

&lt;210&gt; 48

&lt;211&gt; 361

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Tagetes erecta

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Antisense Promotor

&lt;222&gt; (1)..(361)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 48

ctcgagctta ccgatagtaa aatcgtagt tatgattaat acttgggagg tgggggatta 60

taggctttgt tgtgagaatg ttgagaaaga ggtttgacaa atcgggtgttt gaatgaggtt 120

aaatggagtt taattaaaat aaagagaaga gaaagattaa gagggatgat gggatattaa 180

agacggccaa tatagtgatg ccacgtagaa aaaggtaagt gaaaacatac aacgtggctt 240

taaaagatgg cttggctgct aatcaactca actcaactca taccctatcc attcaaattc 300



Fischfutter.ST25.txt

aattcaattc tattgaatgc aaagcaaagc aaagcaaagg ttgtttgttg ttgttggatc 360

c 361

&lt;210&gt; 49

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; kuenstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Primer

&lt;222&gt; (1)..(28)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 49

gagctcactc actgatttcc attgcttg 28

&lt;210&gt; 50

&lt;211&gt; 37

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; kuenstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Primer

&lt;222&gt; (1)..(37)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 50

cgccgttaag tcgatgtccg ttgatttaaa cagtgtc 37

&lt;210&gt; 51

&lt;211&gt; 34

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; kuenstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Primer

&lt;222&gt; (1)..(34)

## Fischfutter.ST25.txt

&lt;223&gt;

<400> 51  
atcaacggac atcgacttaa cggcgtttgt aaac

34

&lt;210&gt; 52

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; kuenstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Primer

&lt;222&gt; (1)..(25)

&lt;223&gt;

<400> 52  
taagcttttt gttgaagaga tttgg

25

&lt;210&gt; 53

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; kuenstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Primer

&lt;222&gt; (1)..(23)

&lt;223&gt;

<400> 53  
gaaaatactt catcagcatt acc

23

&lt;210&gt; 54

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; kuenstliche Sequenz

&lt;220&gt;

## Fischfutter.ST25.txt

<221> Primer

<222> (1)..(28)

<223>

<400> 54  
gtcgactacg taagtttctg cttctacc

28

<210> 55

<211> 26

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(26)

<223>

<400> 55  
ggatccggtg atacctgcac atcaac

26

<210> 56

<211> 28

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(28)

<223>

<400> 56  
aagcttgac gaggcaaagc aaagggtg

28

<210> 57

<211> 29

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(29)

<223>

<400> 57

gtcgacaacc aaatccagta tacagttac

29

<210> 58

<211> 30

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(30)

<223>

<400> 58

aggatccaac caaatccagt atacagttac

30

<210> 59

<211> 28

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(28)

<223>

<400> 59

gaattcgac gaggcaaagc aaagggtg

28

<210> 60

<211> 25

## Fischfutter.ST25.txt

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(25)

<223>

<400> 60  
aagctttgga ttagcactga ttgtc

25

<210> 61

<211> 29

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(29)

<223>

<400> 61  
gtcgacagaa aatacttcat cagcattac

29

<210> 62

<211> 29

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(29)

<223>

<400> 62  
ggatccagaa aatacttcat cagcattac

29

## Fischfutter.ST25.txt

<210> 63  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> kuenstliche Sequenz

<220>  
<221> Primer  
<222> (1)..(27)  
<223>

<400> 63  
gaattctctt tggattagca ctgattg

27

<210> 64  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> kuenstliche Sequenz

<220>  
<221> Primer  
<222> (1)..(23)  
<223>

<400> 64  
cgccttgat ctgtttggat tgg

23

<210> 65  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> kuenstliche Sequenz

<220>  
<221> Primer  
<222> (1)..(24)  
<223>

<400> 65  
ctaacaatca atgagtatga gagc 24

<210> 66

<211> 26

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(26)

<223>

<400> 66  
agagcaaggc cagcaggacc acaacc 26

<210> 67

<211> 26

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(26)

<223>

<400> 67  
ccttgggagc ttttgggata ggctag 26

<210> 68

<211> 26

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(26)

&lt;223&gt;

<400> 68  
tcacgccttg tatctgtttg gattgg

26

&lt;210&gt; 69

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; kuenstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Primer

&lt;222&gt; (1)..(15)

&lt;223&gt;

<400> 69  
gtcgagtatg gagtt

15

&lt;210&gt; 70

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; kuenstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Primer

&lt;222&gt; (1)..(28)

&lt;223&gt;

<400> 70  
aagcttaccg atagtaaaat cgtttagt

28

&lt;210&gt; 71

&lt;211&gt; 31

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; kuenstliche Sequenz

&lt;220&gt;



<221> Primer

<222> (1)..(31)

<223>

<400> 71  
ctcgagctta ccgatagtaa aatcgttagt t

31

<210> 72

<211> 28

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<400> 72  
gtcgacaaca acaacaaaca acctttgc

28

<210> 73

<211> 28

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(28)

<223>

<400> 73  
ggatccaaca acaacaaaca acctttgc

28

<210> 74

<211> 28

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(28)

<223>

<400> 74  
gtcgactttt tgttgaagag atttggtg

28

<210> 75

<211> 28

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(28)

<223>

<400> 75  
ctcgagactc actgatttcc attgcttg

28

<210> 76

<211> 22

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(22)

<223>

<400> 76  
gagctctaca aattagggtt ac

22

<210> 77

<211> 23

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

## Fischfutter.ST25.txt

&lt;222&gt; (1)..(23)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 77

aagcttatta tttccaaatt ccg

23

&lt;210&gt; 78

&lt;211&gt; 50

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; kuenstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Primer

&lt;222&gt; (1)..(50)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 78

aagcttttgca attcatacag aagtgagaaa aatgcagcta gcagcgacag

50

&lt;210&gt; 79

&lt;211&gt; 1062

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Haematococcus pluvialis

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (32)..(1021)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 79

aagcttttgca attcatacag aagtgagaaa a atg cag cta gca gcg aca gta  
 Met Gln Leu Ala Ala Thr Val  
 1 5

52

atg ttg gag cag ctt acc gga agc gct gag gca ctc aag gag aag gag  
 Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu  
 10 15 20

100

aag gag gtt gca ggc agc tct gac gtg ttg cgt aca tgg gcg acc cag  
 Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp Val Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln  
 25 30 35

148

Fischfutter.ST25.txt																
tac Tyr 40	tcg Ser	ctt Leu	ccg Pro	tca Ser	gag Glu 45	gag Glu	tca Ser	gac Asp	gcg Ala 50	gcc Ala 50	cgc Arg	ccg Pro	gga Gly	ctg Leu	aag Lys 55	196
aat Asn	gcc Ala	tac Tyr	aag Lys	cca Pro 60	cca Pro	cct Pro	tcc Ser	gac Asp	aca Thr 65	aag Lys	ggc Gly	atc Ile	aca Thr	atg Met 70	gcg Ala	244
cta Leu	gct Ala	gtc Val	atc Ile 75	ggc Gly	tcc Ser	tgg Trp	gcc Ala	gca Ala 80	gtg Val	ttc Phe	ctc Leu	cac His	gcc Ala 85	att Ile	ttt Phe	292
caa Gln	atc Ile	aag Lys 90	ctt Leu	ccg Pro	acc Thr	tcc Ser	ttg Leu 95	gac Asp	cag Gln	ctg Leu	cac His	tggt Trp 100	ctg Leu	ccc Pro	gtg Val	340
tca Ser	gat Asp 105	gcc Ala	aca Thr	gct Ala	cag Gln	ctg Leu 110	gtt Val	agc Ser	ggc Gly	agc Ser	agc Ser 115	agc Ser	ctg Leu	ctg Leu	cac His	388
atc Ile 120	gtc Val	gta Val	gta Val	ttc Phe	ttt Phe 125	gtc Val	ctg Leu	gag Glu	ttc Phe	ctg Leu 130	tac Tyr	aca Thr	ggc Gly	ctt Leu	ttt Phe 135	436
atc Ile	acc Thr	acg Thr	cat His	gat Asp 140	gct Ala	atg Met	cat His	ggc Gly	acc Thr 145	atc Ile	gcc Ala	atg Met	aga Arg	aac Asn 150	agg Arg	484
cag Gln	ctt Leu	aat Asn	gac Asp 155	ttc Phe	ttg Leu	ggc Gly	aga Arg	gta Val 160	tgc Cys	atc Ile	tcc Ser	ttg Leu	tac Tyr 165	gcc Ala	tggt Trp	532
ttt Phe	gat Asp	tac Tyr 170	aac Asn	atg Met	ctg Leu	cac His	cgc Arg 175	aag Lys	cat His	tggt Trp	gag Glu	cac His 180	cac His	aac Asn	cac His	580
act Thr	ggc Gly 185	gag Glu	gtg Val	ggc Gly	aag Lys	gac Asp 190	cct Pro	gac Asp	ttc Phe	cac His	agg Arg 195	gga Gly	aac Asn	cct Pro	ggc Gly	628
att Ile 200	gtg Val	ccc Pro	tggt Trp	ttt Phe	gcc Ala 205	agc Ser	ttc Phe	atg Met	tcc Ser	agc Ser 210	tac Tyr	atg Met	tcg Ser	atg Met	tggt Trp 215	676
cag Gln	ttt Phe	gcg Ala	cgc Arg	ctc Leu 220	gca Ala	tgg Trp	tgg Trp	acg Thr	gtg Val 225	gtc Val	atg Met	cag Gln	ctg Leu	ctg Leu 230	ggt Gly	724
gcg Ala	cca Pro	atg Met	gcg Ala 235	aac Asn	ctg Leu	ctg Leu	gtg Val 240	ttc Phe	atg Met	gcg Ala	gcc Ala	gcg Ala	ccc Pro 245	atc Ile	ctg Leu	772
tcc Ser	gcc Ala	ttc Phe 250	cgc Arg	ttg Leu	ttc Phe	tac Tyr	ttt Phe 255	ggc Gly	acg Thr	tac Tyr	atg Met	ccc Pro 260	cac His	aag Lys	cct Pro	820
gag Glu	cct Pro 265	ggc Gly	gcc Ala	gcg Ala	tca Ser	ggc Gly 270	tct Ser	tca Ser	cca Pro	gcc Ala	gtc Val 275	atg Met	aac Asn	tggt Trp	tggt Trp	868
aag Lys 280	tcg Ser	cgc Arg	act Thr	agc Ser	cag Gln 285	gcg Ala	tcc Ser	gac Asp	ctg Leu	gtc Val 290	agc Ser	ttt Phe	ctg Leu	acc Thr	tgc Cys 295	916
tac Tyr	cac His	ttc Phe	gac Asp	ctg Leu 300	cac His	tgg Trp	gag Glu	cac His	cac His 305	cgc Arg	tgg Trp	ccc Pro	ttt Phe	gcc Ala 310	ccc Pro	964

## Fischfutter.ST25.txt

tgg tgg gag ctg ccc aac tgc cgc cgc ctg tct ggc cga ggt ctg gtt 1012  
 Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val  
 315 320 325

cct gcc tag ctggacacac tgcagtgggc cctgctgccca gctgggcatg c 1062  
 Pro Ala

<210> 80

<211> 329

<212> PRT

<213> Haematococcus pluvialis

<400> 80

Met Gln Leu Ala Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala  
 1 5 10 15

Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp Val  
 20 25 30

Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser Asp  
 35 40 45

Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser Asp  
 50 55 60

Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser Trp Ala Ala  
 65 70 75 80

Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu Asp  
 85 90 95

Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val Ser  
 100 105 110

Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu Glu  
 115 120 125

Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His Gly  
 130 135 140

Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg Val  
 145 150 155 160

Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg Lys  
 165 170 175

His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp  
 180 185 190

## Fischfutter.ST25.txt

Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met  
 195 200 205

Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp Thr  
 210 215 220

Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val Phe  
 225 230 235 240

Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly  
 245 250 255

Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser Ser  
 260 265 270

Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser Asp  
 275 280 285

Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu His  
 290 295 300

His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg  
 305 310 315 320

Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala  
 325

<210> 81

<211> 789

<212> DNA

<213> Nostoc punctiforme

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(789)

<223>

<400> 81

ttg aat ttt tgt gat aaa cca gtt agc tat tat gtt gca ata gag caa 48  
 Met Asn Phe Cys Asp Lys Pro Val Ser Tyr Tyr Val Ala Ile Glu Gln  
 1 5 10 15

tta agt gct aaa gaa gat act gtt tgg ggg ctg gtg att gtc ata gta 96  
 Leu Ser Ala Lys Glu Asp Thr Val Trp Gly Leu Val Ile Val Ile Val  
 20 25 30

att att agt ctt tgg gta gct agt ttg gct ttt tta cta gct att aat 144  
 Ile Ile Ser Leu Trp Val Ala Ser Leu Ala Phe Leu Leu Ala Ile Asn

															Fischfutter.ST25.txt										
35					40					45															
tat	gcc	aaa	gtc	cca	att	tgg	ttg	ata	cct	att	gca	ata	gtt	tgg	caa	192									
Tyr	Ala	Lys	Val	Pro	Ile	Trp	Leu	Ile	Pro	Ile	Ala	Ile	Val	Trp	Gln										
	50					55					60														
atg	ttc	ctt	tat	aca	ggg	cta	ttt	att	act	gca	cat	gat	gct	atg	cat	240									
Met	Phe	Leu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Phe	Ile	Thr	Ala	His	Asp	Ala	Met	His										
	65				70					75				80											
ggg	tca	gtt	tat	cgt	aaa	aat	ccc	aaa	att	aat	aat	ttt	atc	ggg	tca	288									
Gly	Ser	Val	Tyr	Arg	Lys	Asn	Pro	Lys	Ile	Asn	Asn	Phe	Ile	Gly	Ser										
				85					90					95											
cta	gct	gta	gcg	ctt	tac	gct	gtg	ttt	cca	tat	caa	cag	atg	tta	aag	336									
Leu	Ala	Val	Ala	Leu	Tyr	Ala	Val	Phe	Pro	Tyr	Gln	Gln	Met	Leu	Lys										
			100					105					110												
aat	cat	tgc	tta	cat	cat	cgt	cat	cct	gct	agc	gaa	gtt	gac	cca	gat	384									
Asn	His	Cys	Leu	His	His	Arg	His	Pro	Ala	Ser	Glu	Val	Asp	Pro	Asp										
		115					120					125													
ttt	cat	gat	ggg	aag	aga	aca	aac	gct	att	ttc	tgg	tat	ctc	cat	ttc	432									
Phe	His	Asp	Gly	Lys	Arg	Thr	Asn	Ala	Ile	Phe	Trp	Tyr	Leu	His	Phe										
	130					135					140														
atg	ata	gaa	tac	tcc	agt	tgg	caa	cag	tta	ata	gta	cta	act	atc	cta	480									
Met	Ile	Glu	Tyr	Ser	Ser	Trp	Gln	Gln	Leu	Ile	Val	Leu	Thr	Ile	Leu										
	145				150					155					160										
ttt	aat	tta	gct	aaa	tac	gtt	ttg	cac	atc	cat	caa	ata	aat	ctc	atc	528									
Phe	Asn	Leu	Ala	Lys	Tyr	Val	Leu	His	Ile	His	Gln	Ile	Asn	Leu	Ile										
				165					170					175											
tta	ttt	tgg	agt	att	cct	cca	att	tta	agt	tcc	att	caa	ctg	ttt	tat	576									
Leu	Phe	Trp	Ser	Ile	Pro	Pro	Ile	Leu	Ser	Ser	Ile	Gln	Leu	Phe	Tyr										
			180					185					190												
ttc	gga	aca	ttt	ttg	cct	cat	cga	gaa	ccc	aag	aaa	gga	tat	gtt	tat	624									
Phe	Gly	Thr	Phe	Leu	Pro	His	Arg	Glu	Pro	Lys	Lys	Gly	Tyr	Val	Tyr										
	195						200					205													
ccc	cat	tgc	agc	caa	aca	ata	aaa	ttg	cca	act	ttt	ttg	tca	ttt	atc	672									
Pro	His	Cys	Ser	Gln	Thr	Ile	Lys	Leu	Pro	Thr	Phe	Leu	Ser	Phe	Ile										
	210					215					220														
gct	tgc	tac	cac	ttt	ggg	tat	cat	gaa	gaa	cat	cat	gag	tat	ccc	cat	720									
Ala	Cys	Tyr	His	Phe	Gly	Tyr	His	Glu	Glu	His	His	Glu	Tyr	Pro	His										
	225				230					235					240										
gta	cct	tgg	tgg	caa	ctt	cca	tct	gta	tat	aag	cag	aga	gta	ttc	aac	768									
Val	Pro	Trp	Trp	Gln	Leu	Pro	Ser	Val	Tyr	Lys	Gln	Arg	Val	Phe	Asn										
				245					250					255											
aat	tca	gta	acc	aat	tcg	taa										789									
Asn	Ser	Val	Thr	Asn	Ser																				
			260																						

&lt;210&gt; 82

&lt;211&gt; 262

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Nostoc punctiforme

## Fischfutter.ST25.txt

&lt;400&gt; 82

Met Asn Phe Cys Asp Lys Pro Val Ser Tyr Tyr Val Ala Ile Glu Gln  
 1 5 10 15

Leu Ser Ala Lys Glu Asp Thr Val Trp Gly Leu Val Ile Val Ile Val  
 20 25 30

Ile Ile Ser Leu Trp Val Ala Ser Leu Ala Phe Leu Leu Ala Ile Asn  
 35 40 45

Tyr Ala Lys Val Pro Ile Trp Leu Ile Pro Ile Ala Ile Val Trp Gln  
 50 55 60

Met Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His Asp Ala Met His  
 65 70 75 80

Gly Ser Val Tyr Arg Lys Asn Pro Lys Ile Asn Asn Phe Ile Gly Ser  
 85 90 95

Leu Ala Val Ala Leu Tyr Ala Val Phe Pro Tyr Gln Gln Met Leu Lys  
 100 105 110

Asn His Cys Leu His His Arg His Pro Ala Ser Glu Val Asp Pro Asp  
 115 120 125

Phe His Asp Gly Lys Arg Thr Asn Ala Ile Phe Trp Tyr Leu His Phe  
 130 135 140

Met Ile Glu Tyr Ser Ser Trp Gln Gln Leu Ile Val Leu Thr Ile Leu  
 145 150 155 160

Phe Asn Leu Ala Lys Tyr Val Leu His Ile His Gln Ile Asn Leu Ile  
 165 170 175

Leu Phe Trp Ser Ile Pro Pro Ile Leu Ser Ser Ile Gln Leu Phe Tyr  
 180 185 190

Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Arg Glu Pro Lys Lys Gly Tyr Val Tyr  
 195 200 205

Pro His Cys Ser Gln Thr Ile Lys Leu Pro Thr Phe Leu Ser Phe Ile  
 210 215 220

Ala Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His  
 225 230 235 240

Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Ser Val Tyr Lys Gln Arg Val Phe Asn  
 245 250 255

Asn Ser Val Thr Asn Ser



260

<210> 83  
 <211> 762  
 <212> DNA  
 <213> Nostoc punctiforme

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(762)  
 <223>

<400> 83  
 gtg atc cag tta gaa caa cca ctc agt cat caa gca aaa ctg act cca 48  
 Met Ile Gln Leu Glu Gln Pro Leu Ser His Gln Ala Lys Leu Thr Pro  
 1 5 10 15  
 gta ctg aga agt aaa tct cag ttt aag ggg ctt ttc att gct att gtc 96  
 Val Leu Arg Ser Lys Ser Gln Phe Lys Gly Leu Phe Ile Ala Ile Val  
 20 25 30  
 att gtt agc gca tgg gtc att agc ctg agt tta tta ctt tcc ctt gac 144  
 Ile Val Ser Ala Trp Val Ile Ser Leu Ser Leu Leu Leu Ser Leu Asp  
 35 40 45  
 atc tca aag cta aaa ttt tgg atg tta ttg cct gtt ata cta tgg caa 192  
 Ile Ser Lys Leu Lys Phe Trp Met Leu Leu Pro Val Ile Leu Trp Gln  
 50 55 60  
 aca ttt tta tat acg gga tta ttt att aca tct cat gat gcc atg cat 240  
 Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ser His Asp Ala Met His  
 65 70 75 80  
 ggc gta gta ttt ccc caa aac acc aag att aat cat ttg att gga aca 288  
 Gly Val Val Phe Pro Gln Asn Thr Lys Ile Asn His Leu Ile Gly Thr  
 85 90 95  
 ttg acc cta tcc ctt tat ggt ctt tta cca tat caa aaa cta ttg aaa 336  
 Leu Thr Leu Ser Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Gln Lys Leu Leu Lys  
 100 105 110  
 aaa cat tgg tta cac cac cac aat cca gca agc tca ata gac ccg gat 384  
 Lys His Trp Leu His His His Asn Pro Ala Ser Ser Ile Asp Pro Asp  
 115 120 125  
 ttt cac aat ggt aaa cac caa agt ttc ttt gct tgg tat ttt cat ttt 432  
 Phe His Asn Gly Lys His Gln Ser Phe Phe Ala Trp Tyr Phe His Phe  
 130 135 140  
 atg aaa ggt tac tgg agt tgg ggg caa ata att gcg ttg act att att 480  
 Met Lys Gly Tyr Trp Ser Trp Gly Gln Ile Ile Ala Leu Thr Ile Ile  
 145 150 155 160  
 tat aac ttt gct aaa tac ata ctc cat atc cca agt gat aat cta act 528  
 Tyr Asn Phe Ala Lys Tyr Ile Leu His Ile Pro Ser Asp Asn Leu Thr  
 165 170 175

## Fischfutter.ST25.txt

tac ttt tgg gtg cta ccc tcg ctt tta agt tca tta caa tta ttc tat 576  
 Tyr Phe Trp Val Leu Pro Ser Leu Leu Ser Ser Leu Gln Leu Phe Tyr  
 180 185 190

ttt ggt act ttt tta ccc cat agt gaa cca ata ggg ggt tat gtt cag 624  
 Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser Glu Pro Ile Gly Gly Tyr Val Gln  
 195 200 205

cct cat tgt gcc caa aca att agc cgt cct att tgg tgg tca ttt atc 672  
 Pro His Cys Ala Gln Thr Ile Ser Arg Pro Ile Trp Trp Ser Phe Ile  
 210 215 220

acg tgc tat cat ttt ggc tac cac gag gaa cat cac gaa tat cct cat 720  
 Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His  
 225 230 235 240

att tct tgg tgg cag tta cca gaa att tac aaa gca aaa tag 762  
 Ile Ser Trp Trp Gln Leu Pro Glu Ile Tyr Lys Ala Lys  
 245 250

<210> 84

<211> 253

<212> PRT

<213> Nostoc punctiforme

<400> 84

Met Ile Gln Leu Glu Gln Pro Leu Ser His Gln Ala Lys Leu Thr Pro  
 1 5 10 15

Val Leu Arg Ser Lys Ser Gln Phe Lys Gly Leu Phe Ile Ala Ile Val  
 20 25 30

Ile Val Ser Ala Trp Val Ile Ser Leu Ser Leu Leu Leu Ser Leu Asp  
 35 40 45

Ile Ser Lys Leu Lys Phe Trp Met Leu Leu Pro Val Ile Leu Trp Gln  
 50 55 60

Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ser His Asp Ala Met His  
 65 70 75 80

Gly Val Val Phe Pro Gln Asn Thr Lys Ile Asn His Leu Ile Gly Thr  
 85 90 95

Leu Thr Leu Ser Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Gln Lys Leu Leu Lys  
 100 105 110

Lys His Trp Leu His His His Asn Pro Ala Ser Ser Ile Asp Pro Asp  
 115 120 125

Phe His Asn Gly Lys His Gln Ser Phe Phe Ala Trp Tyr Phe His Phe  
 130 135 140

## Fischfutter.ST25.txt

Met Lys Gly Tyr Trp Ser Trp Gly Gln Ile Ile Ala Leu Thr Ile Ile  
145 150 155 160

Tyr Asn Phe Ala Lys Tyr Ile Leu His Ile Pro Ser Asp Asn Leu Thr  
165 170 175

Tyr Phe Trp Val Leu Pro Ser Leu Leu Ser Ser Leu Gln Leu Phe Tyr  
180 185 190

Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser Glu Pro Ile Gly Gly Tyr Val Gln  
195 200 205

Pro His Cys Ala Gln Thr Ile Ser Arg Pro Ile Trp Trp Ser Phe Ile  
210 215 220

Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His  
225 230 235 240

Ile Ser Trp Trp Gln Leu Pro Glu Ile Tyr Lys Ala Lys  
245 250

<210> 85

<211> 804

<212> DNA

<213> Synechococcus WH8102

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(804)

<223>

<400> 85

atg aaa acg aca aga tct att tcg tgg cca tcg act tgc tgg cat cac	48
Met Lys Thr Thr Arg Ser Ile Ser Trp Pro Ser Thr Cys Trp His His	
1 5 10 15	
cag ccg agt tgc tca agc tgg gtg gca aat gag ttc agc cct cag gcc	96
Gln Pro Ser Cys Ser Ser Trp Val Ala Asn Glu Phe Ser Pro Gln Ala	
20 25 30	
ctc aaa ggg ttg gct ctg gct ggt ctg att gga tca gcc tgg ctg ctc	144
Leu Lys Gly Leu Ala Leu Ala Gly Leu Ile Gly Ser Ala Trp Leu Leu	
35 40 45	
tcc ctg ggc ctg agc tac acc ctg cca ctt gat cag acg cct ggg ctg	192
Ser Leu Gly Leu Ser Tyr Thr Leu Pro Leu Asp Gln Thr Pro Gly Leu	
50 55 60	
ttg att ggc agc ttg att ctg ctc aga gca ttt ctg cac acc ggg ctg	240
Leu Ile Gly Ser Leu Ile Leu Leu Arg Ala Phe Leu His Thr Gly Leu	

Fischfutter.ST25.txt

65	70	75	80	
ttc atc gtt gcc cac gat tcc atg cac gcc agt ctg gtt ccg ggt cat				288
Phe Ile Val Ala His Asp Ser Met His Ala Ser Leu Val Pro Gly His				
	85	90	95	
ccc gga ttg aac cgc tgg atc ggc aaa gtg tat ttg ttg gtg tat gca				336
Pro Gly Leu Asn Arg Trp Ile Gly Lys Val Tyr Leu Leu Val Tyr Ala				
	100	105	110	
ggc ttg tct tat gag cgt tgt tcc cgc aac cac aga cgt cat cac ctg				384
Gly Leu Ser Tyr Glu Arg Cys Ser Arg Asn His Arg Arg His His Leu				
	115	120	125	
gca ccg gag acg ttc cag gat cct gac tac caa cgt tgc acc aat aac				432
Ala Pro Glu Thr Phe Gln Asp Pro Asp Tyr Gln Arg Cys Thr Asn Asn				
	130	135	140	
aac atc cta gat tgg tat gtt cac ttc atg ggc aac tat ctg ggc atg				480
Asn Ile Leu Asp Trp Tyr Val His Phe Met Gly Asn Tyr Leu Gly Met				
	145	150	155	160
cgg caa ctg tta aat cta agc tgt ctt tgg ctg gcg cta atc att ctc				528
Arg Gln Leu Leu Asn Leu Ser Cys Leu Trp Leu Ala Leu Ile Ile Leu				
	165	170	175	
aac ggt tct gat ctc cct gct cag atc atg cat ctg ctg ttg ttc agc				576
Asn Gly Ser Asp Leu Pro Ala Gln Ile Met His Leu Leu Phe Ser				
	180	185	190	
gtt ctg ccg ttg atc atc agt tcc tgt caa ttg ttt cta gtg gga acc				624
Val Leu Pro Leu Ile Ile Ser Ser Cys Gln Leu Phe Leu Val Gly Thr				
	195	200	205	
tgg tta ccc cac cga cgt ggg gcc acg aca cga ccg ggc gtg aca acg				672
Trp Leu Pro His Arg Arg Gly Ala Thr Thr Arg Pro Gly Val Thr Thr				
	210	215	220	
cgc agc ctg gct ttg cat cca gcc ctc tct ttc gca gct tgt tac aac				720
Arg Ser Leu Ala Leu His Pro Ala Leu Ser Phe Ala Ala Cys Tyr Asn				
	225	230	235	240
ttt ggc tat cat cgt gaa cat cat gaa tcg cct tcc aca ccc tgg ttt				768
Phe Gly Tyr His Arg Glu His His Glu Ser Pro Ser Thr Pro Trp Phe				
	245	250	255	
cag ctg cca caa ctt cga aat gaa tca ttc act tga				804
Gln Leu Pro Gln Leu Arg Asn Glu Ser Phe Thr				
	260	265		

&lt;210&gt; 86

&lt;211&gt; 267

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Synechococcus WH8102

&lt;400&gt; 86

Met Lys Thr Thr Arg Ser Ile Ser Trp Pro Ser Thr Cys Trp His His  
 1 5 10 15

Gln Pro Ser Cys Ser Ser Trp Val Ala Asn Glu Phe Ser Pro Gln Ala

Fischfutter.ST25.txt

20

25

30

Leu Lys Gly Leu Ala Leu Ala Gly Leu Ile Gly Ser Ala Trp Leu Leu  
 35 40 45

Ser Leu Gly Leu Ser Tyr Thr Leu Pro Leu Asp Gln Thr Pro Gly Leu  
 50 55 60

Leu Ile Gly Ser Leu Ile Leu Leu Arg Ala Phe Leu His Thr Gly Leu  
 65 70 75 80

Phe Ile Val Ala His Asp Ser Met His Ala Ser Leu Val Pro Gly His  
 85 90 95

Pro Gly Leu Asn Arg Trp Ile Gly Lys Val Tyr Leu Leu Val Tyr Ala  
 100 105 110

Gly Leu Ser Tyr Glu Arg Cys Ser Arg Asn His Arg Arg His His Leu  
 115 120 125

Ala Pro Glu Thr Phe Gln Asp Pro Asp Tyr Gln Arg Cys Thr Asn Asn  
 130 135 140

Asn Ile Leu Asp Trp Tyr Val His Phe Met Gly Asn Tyr Leu Gly Met  
 145 150 155 160

Arg Gln Leu Leu Asn Leu Ser Cys Leu Trp Leu Ala Leu Ile Ile Leu  
 165 170 175

Asn Gly Ser Asp Leu Pro Ala Gln Ile Met His Leu Leu Leu Phe Ser  
 180 185 190

Val Leu Pro Leu Ile Ile Ser Ser Cys Gln Leu Phe Leu Val Gly Thr  
 195 200 205

Trp Leu Pro His Arg Arg Gly Ala Thr Thr Arg Pro Gly Val Thr Thr  
 210 215 220

Arg Ser Leu Ala Leu His Pro Ala Leu Ser Phe Ala Ala Cys Tyr Asn  
 225 230 235 240

Phe Gly Tyr His Arg Glu His His Glu Ser Pro Ser Thr Pro Trp Phe  
 245 250 255

Gln Leu Pro Gln Leu Arg Asn Glu Ser Phe Thr  
 260 265

&lt;210&gt; 87

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; DNA

## Fischfutter.ST25.txt

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(33)

<223>

<400> 87  
gcatgctcta gaccttataa agatattttg tga

33

<210> 88

<211> 33

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(33)

<223>

<400> 88  
gcatgcatct agaaatgggt cagtgtcaac cat

33

<210> 89

<211> 805

<212> DNA

<213> Nostoc sp. Strain PCC7120

<220>

<221> variation

<222> (1)..(805)

<223>

<400> 89  
gcatgcatct agaaatgggt cagtgtcaac catcatctct gcattcagaa aaactgggtg  
tattgtcatc gacaatcaga gatgataaaa atattaataa gggtatatatt attgcctgct

60

120

## Fischfutter.ST25.txt

```

ttatcttatt tttatgggca attagtttaa tcttattact ctcaatagat acatccataa 180
ttcataagag cttattaggt atagccatgc tttggcagac cttcttatat acaggtttat 240
ttattactgc tcatgatgcc atgcacggcg tagtttatcc caaaaatccc agaataaata 300
attttatagg taagctcact ctaatcttgt atggactact cccttataaa gatttattga 360
aaaaacattg gttacaccac ggacatcctg gtactgattt agaccctgat tattacaatg 420
gtcatcccca aaacttcttt ctttgggtatc tacattttat gaagtcttat tggcgatgga 480
cgcaaatttt cggattagtg atgatttttc atggacttaa aaatctggtg catataccag 540
aaaataattt aattatatatt tggatgatac cttctatttt aagttcagta caactatttt 600
attttggtag atttttgcct cataaaaagc tagaagggtg ttatactaac ccccatgttg 660
cgcgcagtat ccctattacc ctttttgggt cttttgttac ttgttatcac ttcggctacc 720
acaaggaaca tcacgaatac cctcaacttc cttggtggaa attacctgaa gctcacaaaa 780
tatctttata aggtctagag catgc 805

```

&lt;210&gt; 90

&lt;211&gt; 35

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; primer\_bind

&lt;222&gt; (1)..(35)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 90

gagctcttca ttatttcgat tttgatttcg tgacc

35

&lt;210&gt; 91

&lt;211&gt; 44

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; primer\_bind

&lt;222&gt; (1)..(44)

&lt;223&gt;

## Fischfutter.ST25.txt

<400> 91  
aagcttgagc tcggttgatc agaagaagaa gaagaagatg aact 44

<210> 92

<211> 653

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> promoter

<222> (1)..(653)

<223>

<400> 92  
gagctcttca ttatttcgat ttgatttcg tgaccagcga acgcagaata cttgttgtg 60  
taatacttta cccgtgtaaa tcaaaaacaa aaaggctttt gagctttttg tagttgaatt 120  
tctctggctg atcttttctg tacagattca tatactctgca gagacgatat cattgattat 180  
ttgagcttct tttgaactat ttcgtgtaat ttgggatgag agctctatgt atgtgtgtaa 240  
actttgaaga caacaagaaa ggtaacaagt gagggaggga tgactccatg tcaaaataga 300  
tgtcataaga ggcccatcaa taagtgttg agcccatag ctagcccagt aactaccaga 360  
ttgtgagatg gatgtgtgaa cagttttttt ttgatgtag gactgaaatg tgaacaacag 420  
gcgcatgaaa ggctaaatta ggacaatgat aagcagaaat aacttatcct ctctaact 480  
tggcctcaca ttgcccttca cacaatccac acacatccaa tcacaacctc atcatatata 540  
tcccgcataat ctttttttct ttgatctttt tttttttgct tattattttt ttgactttga 600  
tctcccatca gttcatcttc ttcttcttct tctgatcaac cgagctcaag ctt 653

<210> 93

<211> 28

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(28)

<223>



## Fischfutter.ST25.txt

<400> 93  
gagctcactc actgatttcc attgcttg 28

<210> 94

<211> 30

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(30)

<223>

<400> 94  
aagcttgagc tctttgttga agagatttgg 30

<210> 95

<211> 37

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(37)

<223>

<400> 95  
cgccgttaag tcgatgtccg ttgatttaaa cagtgtc 37

<210> 96

<211> 34

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(34)

&lt;223&gt;

<400> 96  
 atcaacggac atcgacttaa cggcgtttgt aaac

34

### Patentansprüche

1. Verwendung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes zur oralen Verabreichung an Tiere.
2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes zur Pigmentierung von Tieren und der entsprechenden Tierprodukte verwendet werden.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes Tierfutterzubereitungen beigemischt werden und die Tierfutterzubereitung an Tiere oral verabreicht werden.
4. Verwendung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes vor der Beimischung zu Tierfutterzubereitungen in eine Form prozessiert werden, die eine Beimischung zu Tierfutterzubereitungen ermöglicht.
5. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes direkt an Tiere oral verabreicht werden.
6. Verwendung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes vor der Verabreichung in eine Form prozessiert werden, die eine direkte orale Verabreichung an Tiere ermöglicht.
7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6 dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen der Gattung Tagetes durch genetische Veränderung in die Lage versetzt wurden, Astaxanthin herzustellen.
8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Tiere ausgewählt sind aus der Gruppe Fische, Crustaceae, Galliformes und Anatridae.
9. Verwendung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Tiere ausgewählt sind aus der Gruppe Salmoniden, Shrimps, Krebs, Hühner, Enten, Gänse und Flamingo.
10. Verwendung nach einem der Ansprüche 2 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Tierprodukte ausgewählt sind aus der Gruppe Fleisch, Haut, Feder und Eidotter.
11. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass man als Pflanzenteile Blütenköpfe oder Petalen verwendet.
12. Verfahren zur Herstellung von Tierfutterzubereitungen durch Zusammenfügen von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes und üblichen Tierfutterkomponenten.
13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen

oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes vor dem Zusammenfügen mit Tierfuttermitteln in eine Form prozessiert werden, die ein Zusammenfügen mit Tierfuttermitteln ermöglicht.

14. Verfahren zur Pigmentierung von Tieren oder Tierprodukten durch orale Verabreichung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes an Tiere.

15. Verfahren zur Herstellung von pigmentierten Tieren oder Tierprodukten durch orale Verabreichung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes an Tiere.

16. Verfahren nach Anspruch 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes Tierfutterzubereitungen beigemischt werden und die Tierfutterzubereitung an Tiere oral verabreicht werden.

17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes vor der Beimischung zu Tierfutterzubereitungen in eine Form prozessiert werden, die eine Beimischung zu Tierfutterzubereitungen ermöglicht.

18. Verfahren nach Anspruch 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes direkt an Tiere oral verabreicht werden.

19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes vor der Verabreichung in eine Form prozessiert werden, die eine direkte orale Verabreichung an Tiere ermöglicht.

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 19 dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen der Gattung Tagetes durch genetische Veränderung in die Lage versetzt wurden, Astaxanthin herzustellen.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass die Tiere ausgewählt sind aus der Gruppe Fische, Crustaceae, Galliformes und Anatridae.

22. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass die Tiere ausgewählt sind aus der Gruppe Salmoniden, Shrimps, Krebs, Hühner, Enten, Gänse und Flamingo.

23. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 22, dadurch gekennzeichnet, dass die Tierprodukte ausgewählt sind aus der Gruppe Fleisch, Haut, Feder und Ei.

24. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 23, dadurch gekennzeichnet, dass man als Pflanzenteile Blütenköpfe oder Petalen verwendet.

25. Verwendung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes als Tierfutter oder Tierfutterzusatz.

26. Tierfutterzubereitung, enthaltend astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes.

27. Pigmentiermittel, enthaltend astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes.

28. Pigmentiermittel nach Anspruch 27, bestehend aus astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder aus astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes.

29. Pigmentiermittel nach Anspruch 27 oder 28, dadurch gekennzeichnet, dass man als Pflanzenteile Blütenköpfe oder Petalen verwendet.

Es folgen 15 Blatt Zeichnungen

## Anhängende Zeichnungen

Abbildung 1: Nukleotidsequenzvergleich

KETO2.seq	ATGCAGCTAGCAGCGACAGTAATGTTGGAGCAGCTTACCGGAAGCGCTGAGGCACTCAAGGAGAAGGAGAAGGAGGTTGCAGGCAGCTCTGAOGTGTTC	10C
X86782.seq	ATGCAGCTAGCAGCGACAGTAATGTTGGAGCAGCTTACCGGAAGCGCTGAGGCACTCAAGGAGAAGGAGAAGGAGGTTGCAGGCAGCTCTGAOGTGTTC	10C
KETO2.seq	GTACATGGGOGAOCAGTACTCGCTTCOGTCAGAGGAGTCAGAGCGGCGCCCGGGACTGAAGAATGCCTACAAGCCACCACCTTCOGACACAAGGG	20C
X86782.seq	GTACATGGGOGAOCAGTACTCGCTTCOGTCAGAGGAGTCAGAGCGGCGCCCGGGACTGAAGAATGCCTACAAGCCACCACCTTCOGACACAAGGG	20C
KETO2.seq	CATCACAATGGCGCTAGCTGTTCATCGGCTCCTGGGCGCAGTGTTCCTCCAGGCCATTTTCAAATCAAGCTTCOGACCTCCTTGGACAGCTGCACTGG	30C
X86782.seq	CATCACAATGGCGCTAOGTGTTCATCGGCTCCTGGGCGCAGTGTTCCTCCAGGCCATTTTCAAATCAAGCTTCOGACCTCCTTGGACAGCTGCACTGG	30C
KETO2.seq	CTGCCCCGTGTGATGCCACAGCTCAGCTGGTTAGCGGCAGCAGAGCCTGCTGCACATCGTGTGTAGTATCTTTGTCTGGAGTTCTGTACACAGGCC	40C
X86782.seq	CTGCCCCGTGTGATGCCACAGCTCAGCTGGTTAGCGGCAGCAGAGCCTGCTGCACATCGTGTGTAGTATCTTTGTCTGGAGTTCTGTACACAGGCC	40C
KETO2.seq	TTTTATCAOCAGCATGATGCTATGCATGGCAOCATGCGCATGAGAAACAGGCAGCTTAATGACTTCTTGGGCAGAGTATGCATCTCCTTGTAGCGCTG	50C
X86782.seq	TTTTATCAOCAGCATGATGCTATGCATGGCAOCATGCGCATGAGAAACAGGCAGCTTAATGACTTCTTGGGCAGAGTATGCATCTCCTTGTAGCGCTG	50C
KETO2.seq	GTTTGATTACAACATGCTGCACCCGAAGCATTGGGAGCACCAACACACTGGGAGGTGGGCAAGGACCTGACTTCCACAGGGGAAACCTGGCATT	60C
X86782.seq	GTTTGATTACAACATGCTGCACCCGAAGCATTGGGAGCACCAACACACTGGGAGGTGGGCAAGGACCTGACTTCCACAGGGGAAACCTGGCATT	60C
KETO2.seq	GTGCOCTGGTTTGCCAGCTTCATGTCCAGCTACATGTGATGTGGCAGTTTGGGCGCTCGCATGGTGGACGGTGGTTCATGCAGCTGTGGGTGCGGCAA	70C
X86782.seq	GTGCOCTGGTTTGCCAGCTTCATGTCCAGCTACATGTGATGTGGCAGTTTGGGCGCTCGCATGGTGGACGGTGGTTCATGCAGCTGTGGGTGCGGCAA	70C
KETO2.seq	TGGGAACTGCTGGTGTTCATGGGCGCGCGOCCATCCTGTGCGCTTCGCTTGTCTACTTTGGCACGTACATGCCCCACAAGCTGAGCCTGGCGC	80C
X86782.seq	TGGGAACTGCTGGTGTTCATGGGCGCGCGOCCATCCTGTGCGCTTCGCTTGTCTACTTTGGCACGTACATGCCCCACAAGCTGAGCCTGGCGC	80C
KETO2.seq	CGCGTCAGGCTCTTCAOCAGCGTCATGAACGTGGTGGAGTGGGCACTAGCCAGGCGTCCGACCTGGTCAGCTTTCTGACCTGCTACCACTTCGACCTG	90C
X86782.seq	CGCGTCAGGCTCTTCAOCAGCGTCATGAACGTGGTGGAGTGGGCACTAGCCAGGCGTCCGACCTGGTCAGCTTTCTGACCTGCTACCACTTCGACCTG	90C
KETO2.seq	CACCTGGGAGCAOCACGCTGGCCCTTTGCCOCTGGTGGGAGCTGCCAACCTGCCGCGCTGTCTGGCCGAGGTCTGGTTCTGCTAG	99C
X86782.seq	CACCTGGGAGCAOCACGCTGGCCCTTTGCCOCTGGTGGGAGCTGCCAACCTGCCGCGCTGTCTGGCCGAGGTCTGGTTCTGCTAG	99C

Abbildung 2: Proteinsequenzvergleich

```

KETO2.pro  M Q L A A T V M L E Q L T G S A E A L K E K E K E V A G S S D V L R T W A T Q Y S L P S E E S D A A 50
X86782.pro M Q L A A T V M L E Q L T G S A E A L K E K E K E V A G S S D V L R T W A T Q Y S L P S E E S D A A 50

KETO2.pro  R P G L K N A Y K P P P S D T K G I T M A L A V I G S W A A V F L H A I F Q I K L P T S L D Q L H W 10
X86782.pro R P G L K N A Y K P P P S D T K G I T M A L R V I G S W A A V F L H A I F Q I K L P T S L D Q L H W 10

KETO2.pro  L P V S D A T A Q L V S G S S S L L H I V V V F F V L E F L Y T G L F I T T H D A M H G T I A M R N 15
X86782.pro L P V S D A T A Q L V S G T S S L L D I V V V F F V L E F L Y T G L F I T T H D A M H G T I A M R N 15

KETO2.pro  R Q L N D F L G R V C I S L Y A W F D Y N M L H R K H W E H H N H T G E V G K D P D F H R G N P G I 20
X86782.pro R Q L N D F L G R V C I S L Y A W F D Y N M L H R K H W E H H N H T G E V G K D P D F H R G N P G I 20

KETO2.pro  V P W F A S F M S S Y M S M W Q F A R L A W W T V V M Q L L G A P M A N L L V F M A A A P I L S A F 25
X86782.pro V P W F A S F M S S Y M S M W Q F A R L A W W T V V M Q L L G A P M A N L L V F M A A A P I L S A F 25

KETO2.pro  R L F Y F G T Y M P H K P E P G A A S G S S P A V M N W W K S R T S Q A S D L V S F L T C Y H F D L 30
X86782.pro R L F Y F G T Y M P H K P E P G A A S G S S P A V M N W W K S R T S Q A S D L V S F L T C Y H F D L 30

KETO2.pro  H W E H H R W P F A P W W E L P N C R R L S G R G L V P A 32
X86782.pro H W E H H R W P F A P W W E L P N C R R L S G R G L V P A 32

```

Abbildung 3: Konstrukt zur Überexpression des Ketolase (b-C-4-Oxygenase) Proteins aus *H. pluvialis* mit rbcS Transitpeptid aus Erbse unter Kontrolle des d35S-Promoters (Tagetesttransformationskonstrukt)

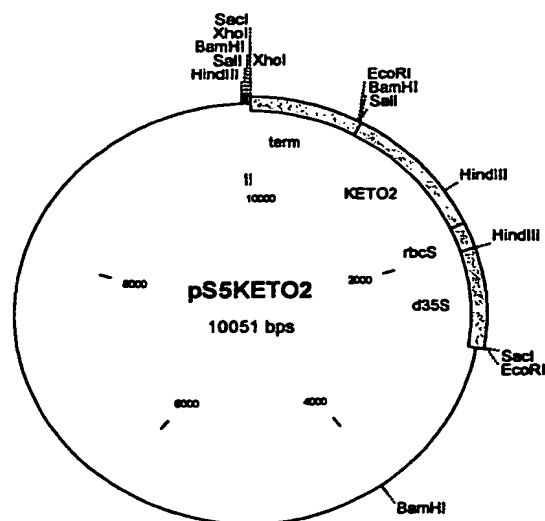


Abbildung 4:

Konstrukt pS5AP3PKETO2 zur Überexpression der Ketolase (b-C-4-Oxygenase) Proteins aus *H. pluvialis* mit *rbcs* Transitpeptide aus Erbse unter Kontrolle des AP3P-Promoters (Ziellabeltransformationskonstrukt) .

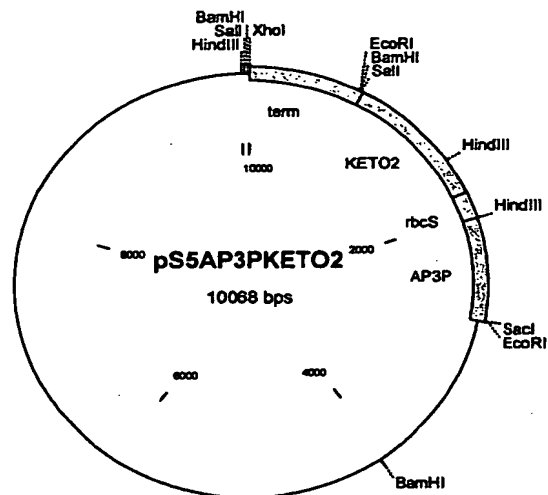




Abbildung 5

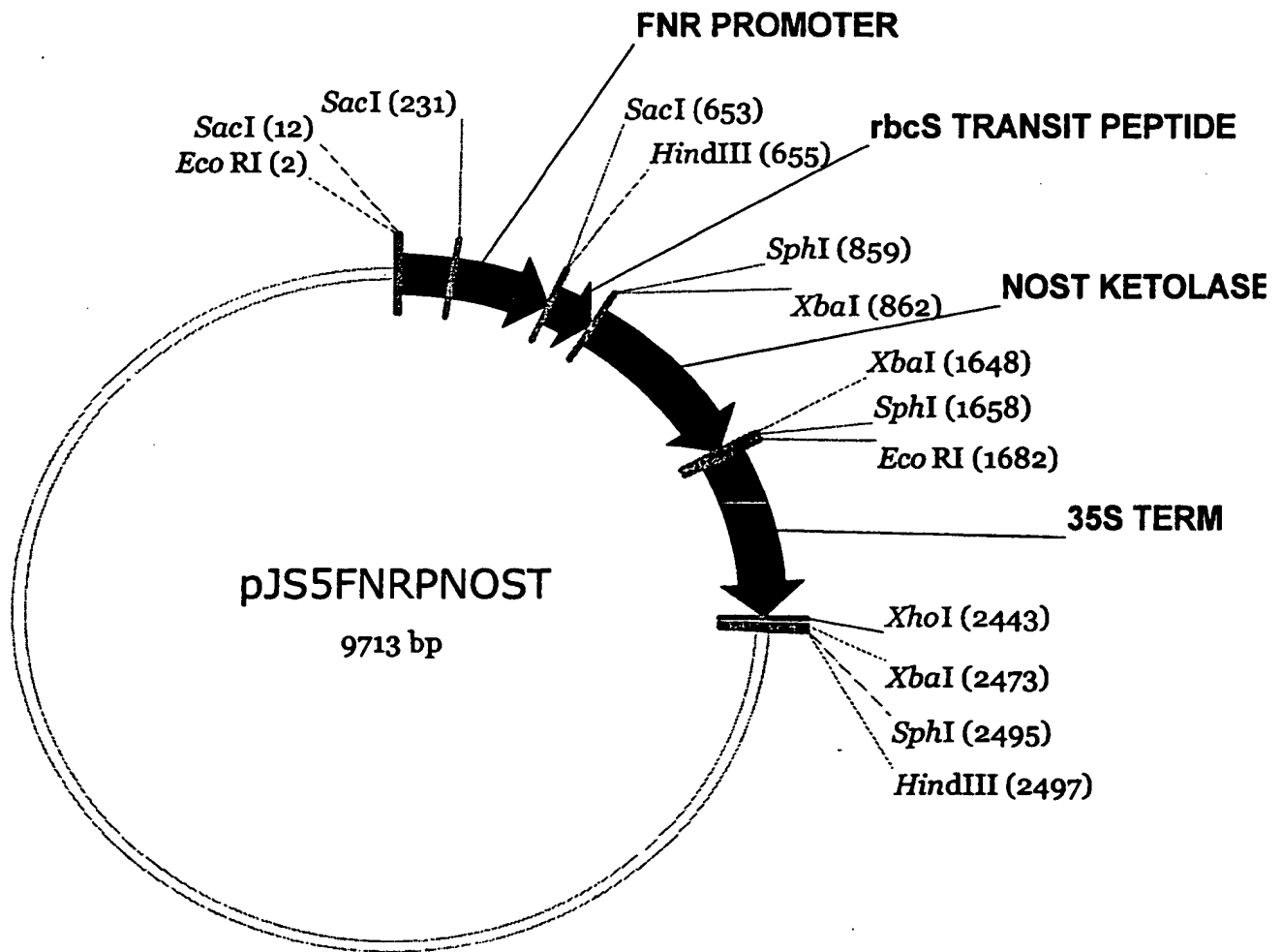


Abbildung 6

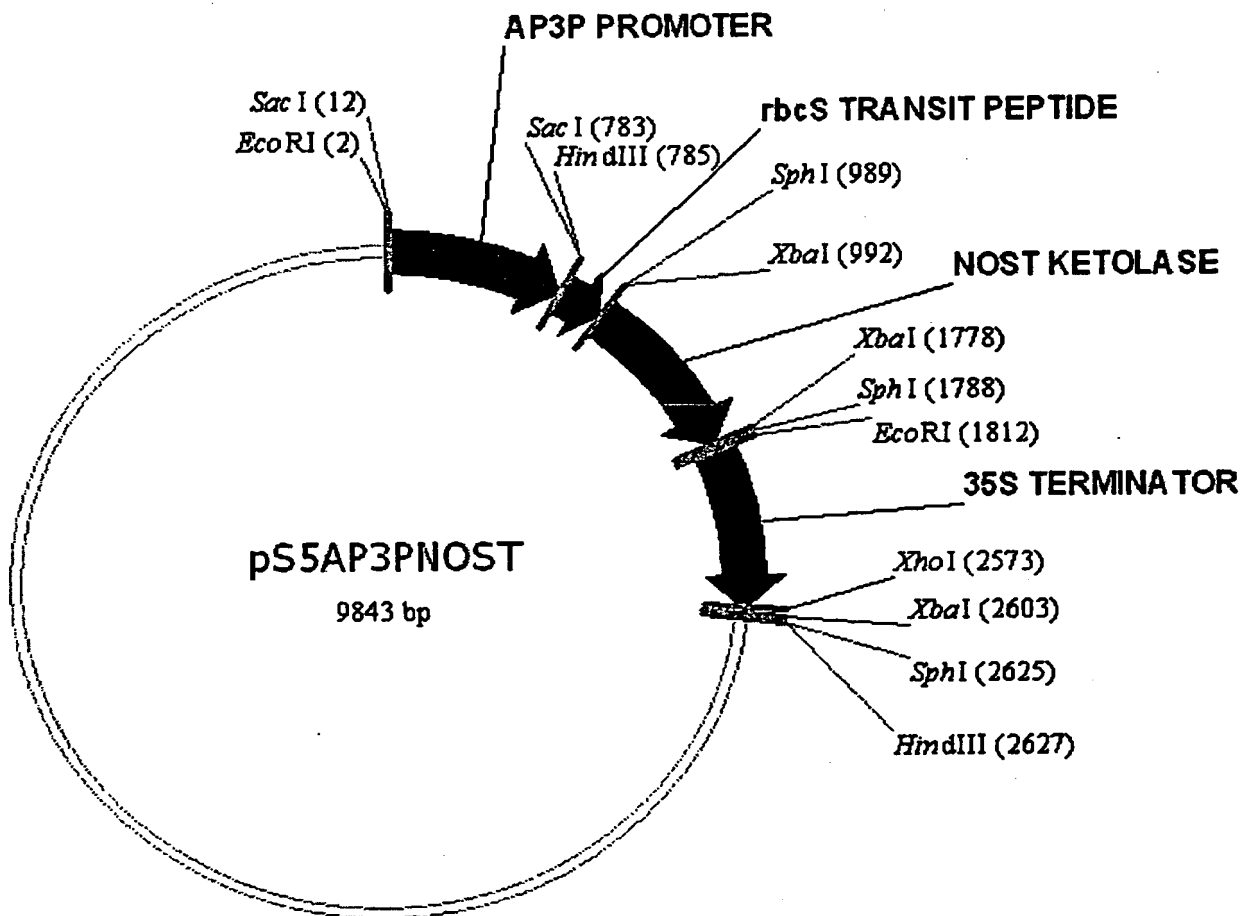


Abbildung 7: Klonierungskassette zur Herstellung von Inverted-Repeat-Expressionskassetten für die blüten-spezifische Expression von Epsilon-Cyclase dsRNAs in *Tagetes erecta*

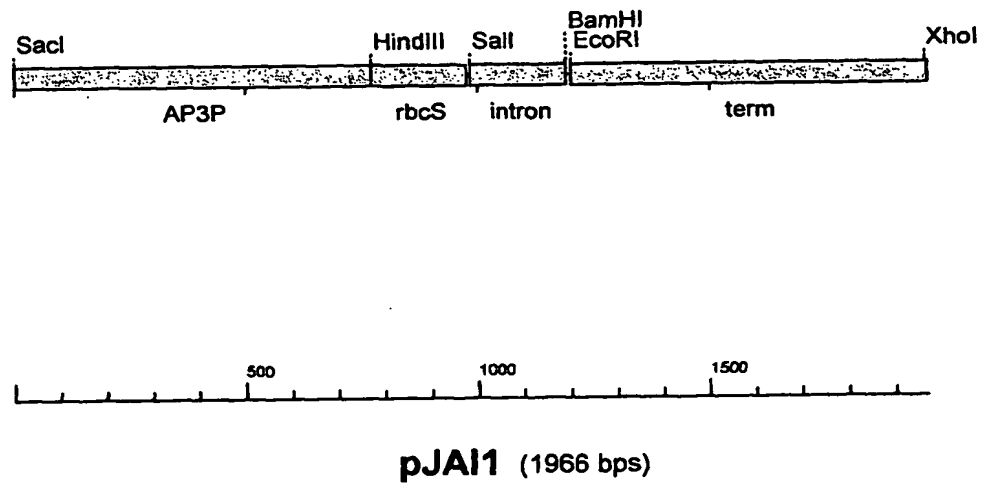


Abbildung 8: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend 5'terminale Fragmente der Epsilon-Cyclase cDNA (AF251016) unter Kontrolle des AP3P-Promoters

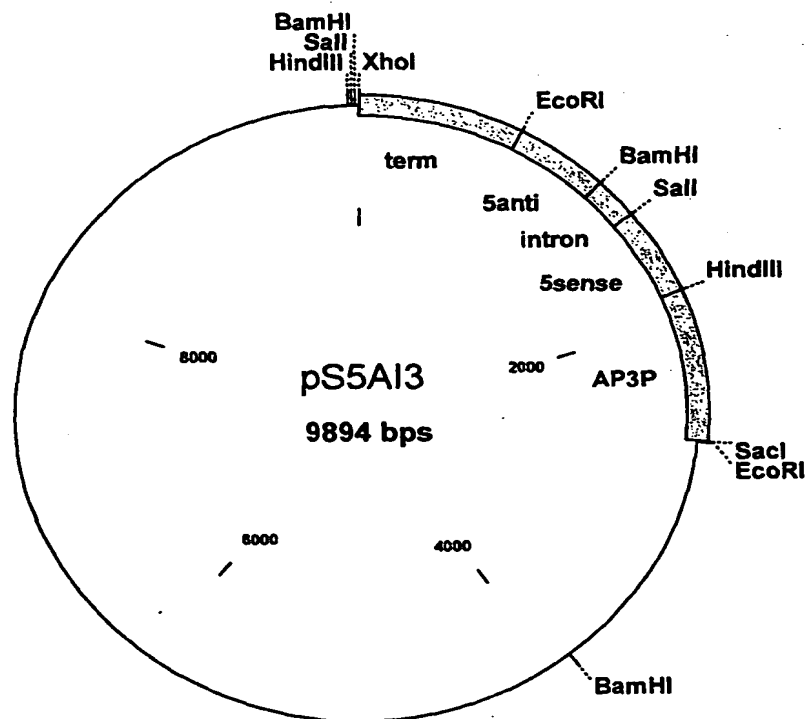


Abbildung 9: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend 5'terminale Fragmente der Epsilon-Cyclase cDNA (AF251016) unter Kontrolle des CHRC-Promoters

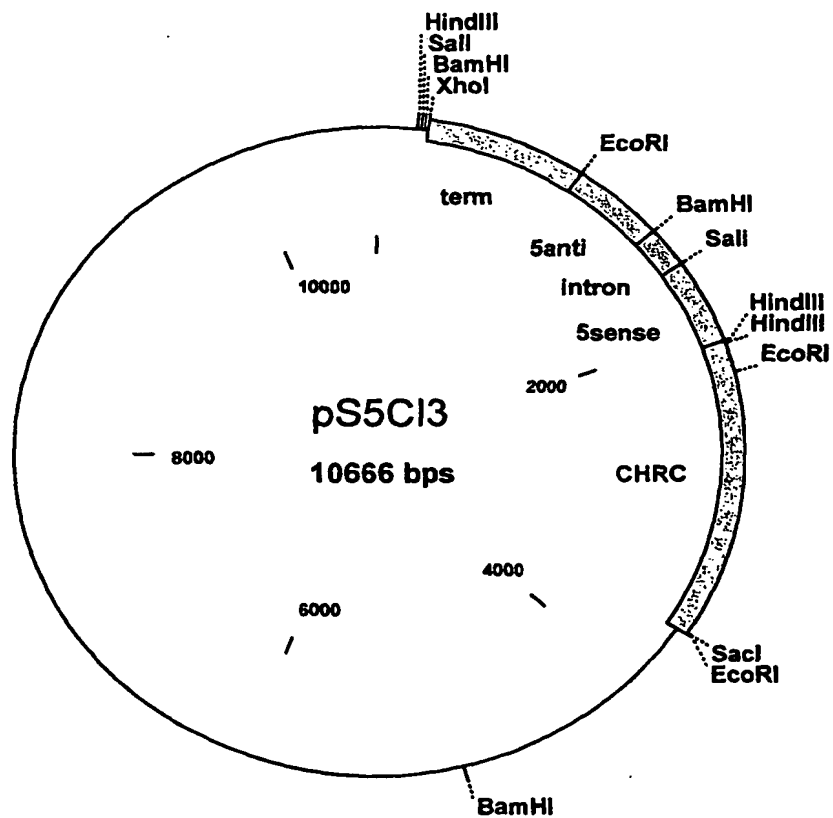


Abbildung 10: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend 3'terminalen Fragmente der Epsilon-Cyclase cDNA (AF251016) unter Kontrolle des AP3P-Promoters

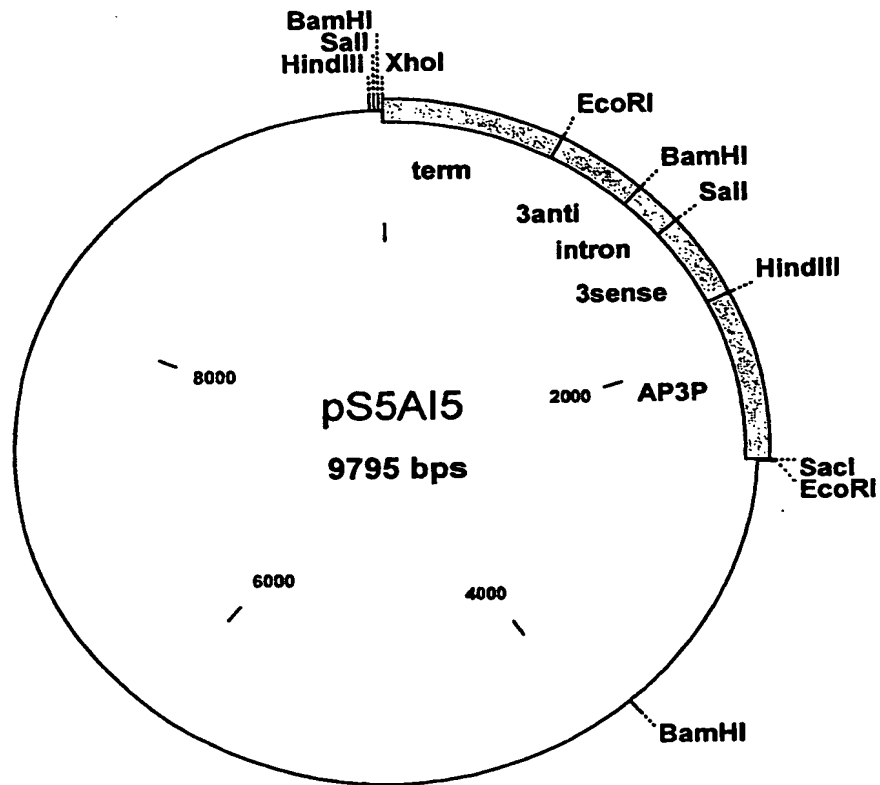


Abbildung 11: Inverse PCR-Amplifikat, das das 312 bp Fragment des Epsilon-Cyclase Promoters enthält

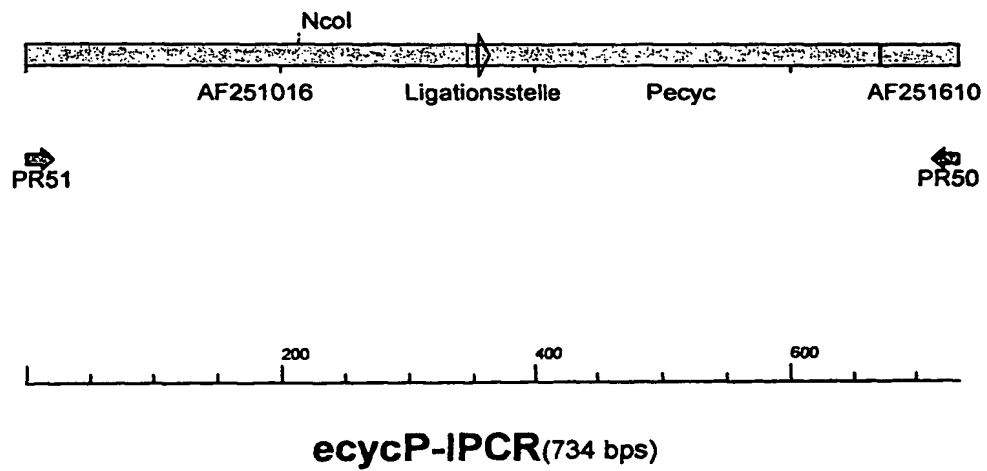


Abbildung 12: TAIL PCR-Amplifikat, das das 199 bp Fragment  
des Epsilon-Cyclase Promoters enthält

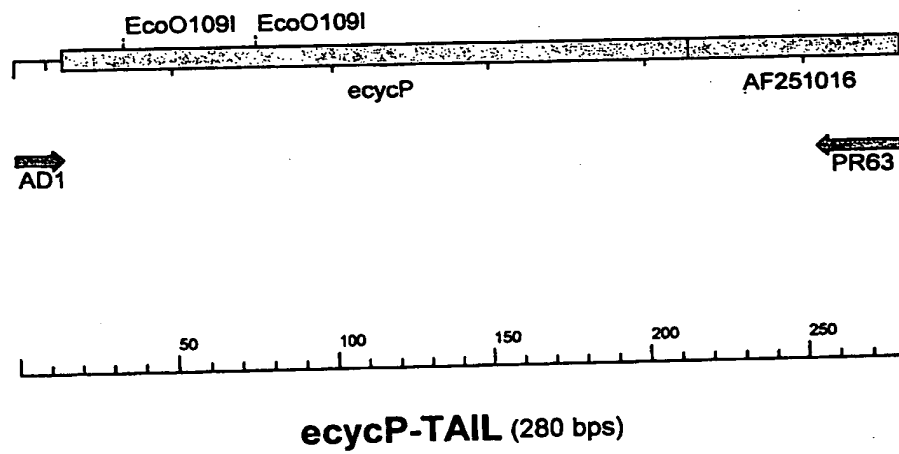




Abbildung 13: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend das 312 bp5 Promoterfragment der Epsilon-Cyclase unter Kontrolle des AP3P-Promoters

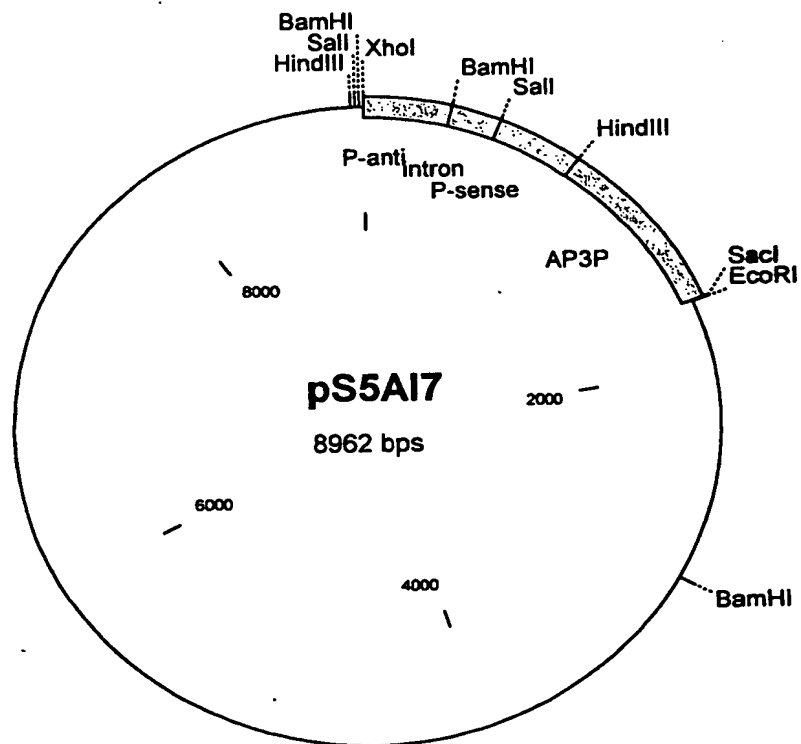


Abbildung 14: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase unter Kontrolle des CHRC-Promoters

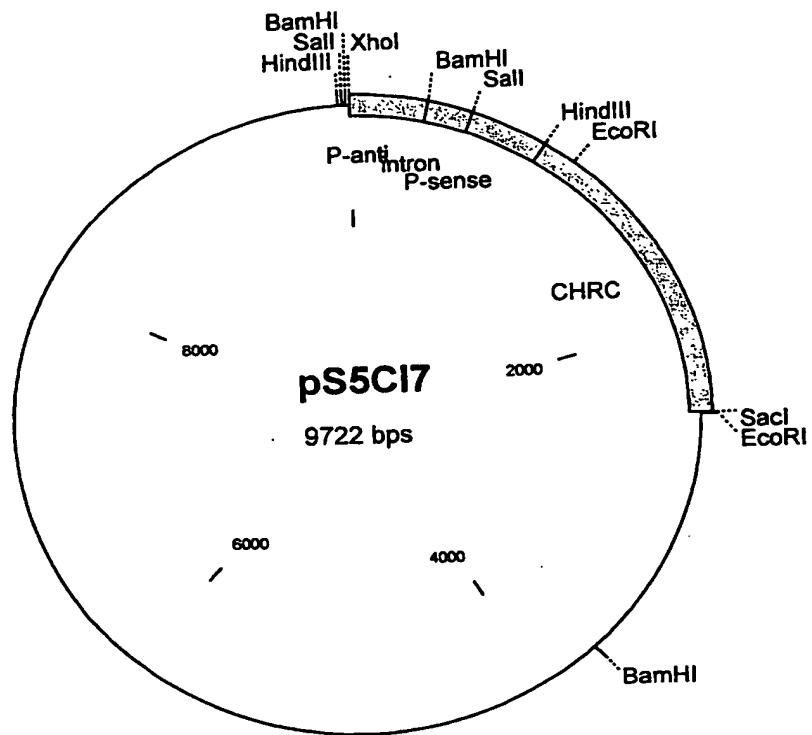
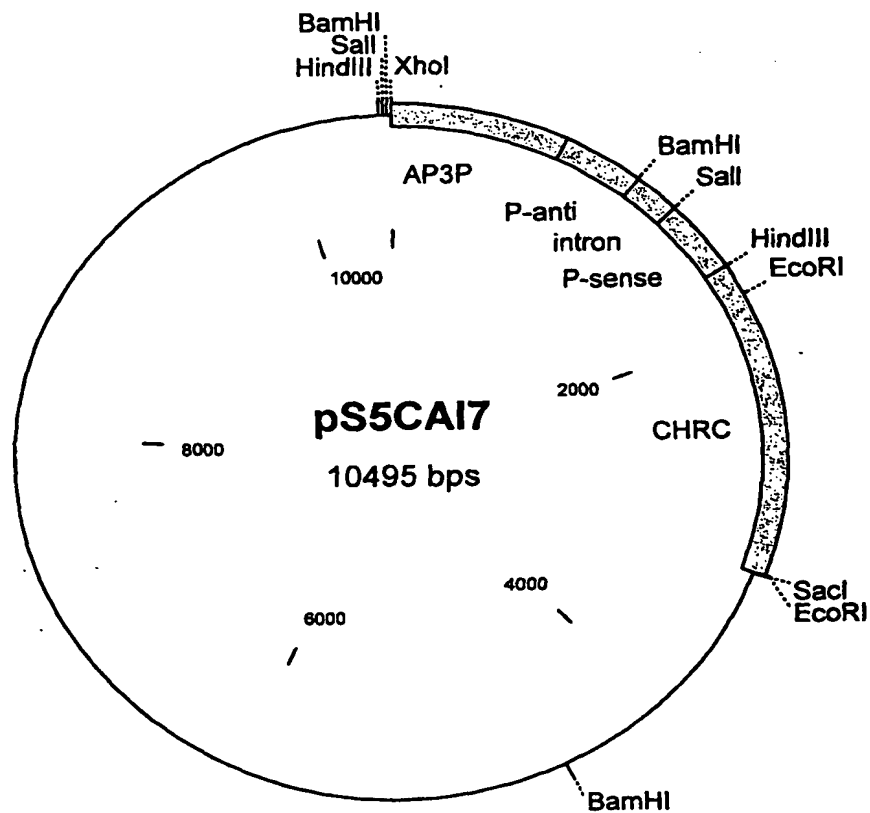


Abbildung 15: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend das 312 bp5 Promoterfragment der Epsilon-Cyclase unter Kontrolle sowohl des AP3P-Promoters als auch des CHRC-Promoters



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**